

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RENAN ANTONIO CERETTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CANABIDIOL SOBRE OS
PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS E COMPORTAMENTAIS
EM MODELO EXPERIMENTAL DE MENINGITE
PNEUMOCÓCICA**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana
Barichello

**CRICIÚMA
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C414a Ceretta, Renan Antônio.

Avaliação dos efeitos do Canabidiol sobre os parâmetros inflamatórios e comportamentais em modelo experimental de Meningite pneumocócica / Renan Antônio Ceretta; orientadora: Tatiana Barichello. – Criciúma, SC: Ed. do Autor, 2015.

80 p: il.; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul

Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2015.

1. Meningite pneumocócica – Tratamento. 2. Canabidiol – Uso terapêutico. 3. Agentes antinfeciosos. 4. Citocinas. 5. Ceftriaxona. I. Título.

CDD. 22^a ed. 615.1



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pelo candidato **Renan Antônio Ceretta** sob o título “**Avaliação dos efeitos do canabidiol sobre os parâmetros inflamatórios e comportamentais em modelo experimental de meningite pneumocócica**”, para obtenção do grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese.

Criciúma, SC, 04 de fevereiro de 2016.

Alexandra Zugno
Prof.ª Dr.ª ALEXANDRA JOPPI ZUGNO
Membro Relator - UNESC

Felipe Dal Pizzol
Prof. Dr. FELIPE DAL-PIZZOL
Membro Interno - UNESC

Fabricia Petronilho
Prof.ª Dr.ª FABRICIA PETRONILHO
Membro Externo - UNISUL

Adair Roberto Soares dos Santos
Prof. Dr. ADAIR DOS SANTOS
Membro Externo - UFSC

Tatiana Barichello
Prof.ª Dr.ª Tatiana Barichello
Orientadora

Claudio Teodoro de Souza
Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese de doutorado foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Microbiologia Experimental e Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os momentos difíceis que me tornaram mais forte e por todos os momentos de alegria que me fizeram sorrir.

À Profa. Dra. Tatiana Barichello, orientadora desta tese, por toda dedicação, paciência e comprometimento, por me proporcionar participação do seu grupo de pesquisa e acima de tudo poder estar ao seu lado compartilhando sua experiência profissional e seus ensinamentos.

À Jaqueline Generoso, Lutiana Roque Simões, Allan Colladel, Ana Paula Moreira, Cristiano Faller, Cássia Rafael, Jéssica Goulart, Paulo Eduardo Aveline, Gustavo Sangiogo e a todos os demais colegas do Laboratório de Microbiologia Experimental pelo seu apoio e incentivo na realização deste trabalho, por me auxiliarem nas dificuldades, por esclarecerem minhas dúvidas.

À minha esposa Luciane Bisognin Ceretta e à minha filha Vitória Bisognin Ceretta, pelo carinho, atenção e amor, pelas palavras de incentivo nos momentos de desânimo, pelos abraços apertados que me confortava nos momentos difíceis, e por não medirem esforços para que eu nunca desistisse de realizar mais esta conquista.

À minha família pela confiança e por estarem sempre presentes em todos os momentos que precisei dividir minha ansiedade, angústia ou alegria.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de certa forma estiveram sempre torcendo por mim, incentivando-me e confiando em meu potencial para que pudesse concluir este trabalho.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

A meningite bacteriana é uma grave infecção do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por uma intensa resposta inflamatória nas meninges e no espaço subaracnóide. Esta inflamação gera uma exacerbada resposta imune lesionando o tecido neuronal causando prejuízos de aprendizagem e memória. Estudos utilizando o canabidiol (CBD), um composto não psicotrópico derivado da *Cannabis sativa* têm demonstrado seus efeitos benéficos em modelos pré-clínicos de inflamação e lesão tecidual, incluindo o seu poder antioxidante e propriedades anti-inflamatórias, protegendo neurônios contra estímulos neurotóxicos ou neurodegenerativos. O objetivo desse estudo é demonstrar a ação do CBD sobre os parâmetros inflamatórios e comportamentais em ratos Wistar adultos submetidos ao modelo experimental de meningite pneumocócica. Os animais foram submetidos à injeção na cisterna magna de 10 µL de suspensão bacteriana de *Streptococcus pneumoniae* ou volume equivalente de líquido cefalorraquidiano (LCR) artificial para o grupo controle. Para avaliação dos níveis de fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , IL-6, citocina quimiotática indutora de neutrófilos-1 (CINC-1) e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) os animais foram divididos em controle, meningite/salina, meningite/CBD 2,5 mg/kg, meningite/CBD 5 mg/kg e meningite/CBD 10 mg/kg e o CBD foi administrado via intraperitoneal (i.p) imediatamente após a indução da meningite, seis horas após a injeção os animais foram mortos e o hipocampo e córtex pré-frontal retirados. Para a avaliação comportamental, 18 horas após a indução foi iniciado o tratamento com ceftriaxona e CBD. Para o teste de esQUIVA inibitória os animais foram divididos nos mesmos grupos acima descritos e receberam CBD uma vez ao dia durante nove dias e para a realização do teste de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos os animais foram divididos em grupos controle, controle/CBD 10 mg/kg, meningite/salina e meningite/CBD 10 mg/kg e receberam CBD uma vez ao dia durante nove dias. No décimo dia após a indução os animais foram mortos e as estruturas cerebrais hipocampo e córtex pré-frontal retiradas para dosagens de TNF- α e BDNF. Os níveis de TNF- α e CINC-1 foram aumentados em todos os grupos meningites tratados ou não com CBD comparado ao grupo controle no hipocampo e no córtex pré-frontal. Os níveis de IL-1 β , IL-6 e BDNF não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Nos testes comportamentais de esQUIVA inibitória,

habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos os animais que receberam tratamento com 10 mg/kg de CBD demonstraram prevenção no dano de memória e aprendizado, ambos encontrados no grupo meningite. Os níveis de TNF- α foram diminuídos 10 dias após a indução nos grupos meningite tratados com as diferentes doses de CBD em comparação com o grupo meningite que não recebeu tratamento no córtex pré-frontal e os níveis de BDNF foram aumentados nos mesmos grupos. No hipocampo os níveis de TNF α e BDNF não apresentaram alterações. Estes resultados demonstram que o tratamento com CBD desempenha um papel anti-inflamatório na meningite pneumocócica e previne danos cognitivos, possivelmente representando uma nova abordagem farmacológica no tratamento dessa grave infecção do SNC.

Palavras chaves: Meningite pneumocócica, *Streptococcus pneumoniae*, canabidiol, citocinas, memória.

ABSTRACT

Bacterial meningitis is a serious infection of the central nervous system (CNS) characterized by an intense inflammatory response in the meninges and the subarachnoid space. This inflammation generates an exaggerated immune response injuring the neuronal tissue causing learning and memory damage. Studies using cannabidiol (CBD) a cannabinoid compound, non-psychotropic derived from *Cannabis sativa* have shown beneficial effects in preclinical models of inflammation and tissue injury, including their antioxidant properties and anti-inflammatory properties acting in protecting neurons before neurotoxic or neurodegenerative stimuli. The aim of this study is to demonstrate the action of the CBD on inflammatory and behavioral parameters in adult Wistar rats underwent experimental model of pneumococcal meningitis. The animals were subjected to an injection into the cistern magna of 10 μ L of bacterial suspension of *Streptococcus pneumoniae* or equivalent volume of cerebrospinal fluid (CSF) artificial for the control group. For review of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, cytokine-induced neurotrophil chemoattractant type 1 (CINC-1) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) levels, CBD was administered intraperitoneally (i.p) immediately after induction of meningitis in doses of 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg, six hours after the injection the animals were killed and the hippocampus and prefrontal cortex removed. For behavioral analysis, 18 hours after induction treatment was initiated with ceftriaxone and CBD for inhibitory avoidance test, animals received varying doses of CBD, 2.5 mg/kg, 5 mg/kg and 10 mg/kg one once daily for nine days and for carrying out the behavioral tests of habituation to the open and inhibitory avoidance animals received 10 mg/kg CBD once daily for nine days. On the tenth day after the behavioral tests, the animals were killed and the brain structures hippocampus and prefrontal cortex removed at dosages of TNF- α and BDNF. The levels of TNF- α and CINC-1 were increased in all treated groups with or without meningitis CBD compared to the control group in hippocampus and prefrontal cortex. IL-1 β levels, IL-6 and BDNF showed no significant difference between groups. In behavioral testing inhibitory avoidance, habituation to the open field and object recognition animals that were treated with 10 mg/kg CBD have shown prevention in the learning and memory damages both found in meningitis group. TNF- α levels were reduced 10 days after the induction in meningitis groups treated with different doses of CBD compared with meningitis group that received no treatment in

the prefrontal cortex and BDNF levels were increased in the same groups in TNF and hippocampal BDNF levels showed no change. These results demonstrate that treatment with CBD has an anti-inflammatory role for pneumococcal meningitis and preventing cognitive impairments, possibly representing a new pharmacological approach to the treatment of this serious infection of the CNS.

Keywords: Pneumococcal meningitis, *Streptococcus pneumoniae*, cannabidiol, cytokine, memory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fisiopatologia do <i>S. pneumoniae</i> no SNC: aderência, invasão e resposta do hospedeiro.	35
Figura 2: Migração de leucócitos.	36
Figura 3: Representação das principais citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta a produtos bacterianos.	39
Figura 4: Potenciais terapêuticos do CBD.	42
Figura 5: Representação do tempo de indução da meningite, tratamento com CBD e a morte dos animais para avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e BDNF r.	46
Figura 6: Representação do tempo de indução da meningite, tratamento com ceftriaxona e CBD e morte dos animais para realização dos testes comportamentais.	47
Figura 7: Teste de esquia inibitória.	49
Figura 8: Teste de habituação ao campo aberto.	50
Figura 9: Teste de reconhecimento de objetos.	51
Figura 10: Avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, CINC-1 e BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos 6 horas após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	53
Figura 11: Avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, CINC-1 e BDNF no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 6 horas após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	54
Figura 12: Teste de esquia inibitória 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	55
Figura 13: Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	56
Figura 14: Teste de reconhecimento de objeto 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	57
Figura 15: Avaliação dos níveis de TNF- α e BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	58
Figura 16: Avaliação dos níveis de TNF- α , e BDNF no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite por <i>S. pneumoniae</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA: Análise da Variância (do inglês, *Analysis of variance*)
- BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (do inglês, *Brain Derived Neurotrophic Factor*)
- BHE: Barreira Hematoencefálica
- C3b: Complemento 3b
- CBD: Canabidiol
- CINC-1: Citocina Quimiotática Indutora de Neutrófilos-1 (do inglês, *Cytokine-induced neutrophil chemoattractant type 1*)
- ELISA: Ensaio Imunoenzimático (do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)
- EPM: Erro Padrão da Média
- ERO: Espécies Reativas ao Oxigênio
- GSK3B: Glicogênio Sintase Quinase 3-B (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3B*)
- IgA: imunoglobulina A
- IL: Interleucina
- I.p: Intraperitoneal
- IRAK-4: Receptor de Interleucina Associado à Quinase 4 (do inglês, *Interleukin Receptor Associated kinase 4*)
- LCR: Líquido Cefalorraquidiano
- LPS: Lipopolissacarídeo
- MMPs: Metaloproteinases de Matriz
- MyD88: Fator de Diferenciação Mielóide 88 (do inglês, *Myeloid Differentiation Factor 88*)
- NF- κ B: Fator Nuclear kappa β (do inglês, *Nuclear factor kappa β*)

NOD: Domínio de Oligomerização de Ligação de Nucleotídeos (do inglês, *Nucleotide Binding Oligomerization Domain*)

PAF: Fator de Ativação de Plaquetas (do inglês, *Platelet Activating Factor*)

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*)

PPAR: Receptor Proliferador de Peroxissoma (do inglês, *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*)

PRRs: Receptores de Reconhecimento Padrão (do inglês, *Pattern Recognition Receptors*)

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SNC: Sistema Nervoso Central

SPSS: Pacote Estatístico para Ciências Sociais (do inglês, *Statistical Package for Social Sciences*)

TIR: Receptor de interleucina Toll (do inglês, *Toll Interleukine Receptor*)

TLRs: Receptores Toll-like (do inglês, *Toll-like Receptors*)

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alpha (do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TRAF: Fator associado ao fator de necrose tumoral (do inglês, *Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Factor*)

TRAK: Fator associado ao fator de necrose tumoral quinase (do inglês, *Tumour Necrosis Factor Receptor-Associated Factor Kinase*)

UFCol/mL: Unidade Formadora de Colônia por mL

UNESC: Universidade do Extremo Sul Catarinense

VEFG: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 MENINGITE.....	29
1.2 EPIDEMIOLOGIA	30
1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO PNEUMOCOCO	31
1.4 FISIOPATOLOGIA DA MENINGITE BACTERIANA	33
1.5 CITOCINAS E QUIMIOCINAS	36
1.6 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO(BDNF).....	39
1.7 CANABIDIOL.....	40
1.8 JUSTIFICATIVA.....	42
2. OBJETIVOS.....	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	44
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	44
3.3 ORGANISMO INFECTANTE	44
3.4 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE	44
3.5 TRATAMENTO E MODELO EXPERIMENTAL	45
3.5.1 Protocolo para avaliação dos parametros inflamatórios	45
3.5.2 Protocolo para realização dos testes comportamentais.....	46
3.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA.....	47
3.6.1 Citocinas, quimiocinas e BDNF	47
3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	48
3.7.1 Esquiva Inibitória.....	48
3.7.2 Habituação ao campo aberto.....	49
3.7.3 Reconhecimento de Objetos	50
3.8 ESTATÍSTICA.....	51
4 RESULTADOS.....	52
5 DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 MENINGITE

A meningite é uma doença inflamatória que envolve as meninges e o espaço subaracnóide e clinicamente se manifesta com dor de cabeça e rigidez de nuca e é diagnosticada em pacientes por exame no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Richie e Josephson, 2015). As meninges mais afetadas são a pia-máter e a aracnóide podendo resultar em danos nas estruturas corticais e subcorticais do cérebro (Meli et al., 2002). A meningite bacteriana induz uma resposta inflamatória sistêmica distinta que tem sido bem descrita em humanos e em modelos experimentais utilizando animais (Morichi et al., 2013). Esta inflamação gera uma exacerbada resposta imune que lesiona o tecido neuronal causando prejuízos de aprendizagem e memória (Van De Beek et al., 2002; Irazuzta et al., 2005; Barichello et al., 2010a).

A meningite bacteriana possui alta taxa de mortalidade e morbidade em adultos, crianças e recém-nascidos, que variam de acordo com as condições socioeconômicas, estado imunológico, localização geográfica e o agente patogênico (Kim, 2010; McIntyre et al., 2012). Além disso, sequelas neurológicas são relativamente comuns nos sobreviventes de meningite bacteriana, incluindo déficit sensorio motor, convulsões, prejuízos no aprendizado e na memória, déficit de atenção, lentidão de resposta auditiva e cegueira (Gianinazzi et al., 2004; Hoogman et al., 2007).

Dados de avaliações histopatológicas em humanos demonstraram que os danos ao parênquima cerebral na meningite podem ser causados por um aumento na pressão intracraniana, edema citotóxico e vasogênico, herniação cerebral e infiltração local de leucócitos ou formação de abscessos, assim como pela necrose cortical e perda neuronal hipocampal (Grandgirard et al., 2007a; Mook-Kanamori et al., 2011).

A falta de uniformidade nos danos ocasionados gera uma dificuldade para avaliar a severidade e o grau dos prejuízos neuronais, dificultando a quantificação dos danos cerebrais, especialmente em períodos imediatamente após a lesão, criando obstáculos para novas terapias eficazes no tratamento da meningite bacteriana (Sellner et al., 2010).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Estimativas apontam aproximadamente 1,2 milhões de casos de meningite, sendo responsável por um número estimado de 171.000 mortes no mundo a cada ano (Ceyhan et al., 2008). Apesar do aumento da disponibilidade antimicrobiana e de cuidados intensivos a meningite bacteriana continua sendo uma significativa causa de morbidade e mortalidade, apresentando uma taxa de mortalidade de 20-30% (Brouwer et al., 2010). Aproximadamente 50% dos sobreviventes apresentam graves distúrbios neurológicos e neuropsicológicos, sendo evidenciada associação, inclusive, com doenças psiquiátricas como psicose e esquizofrenia (Abraham et al., 2005). Na população em geral, a taxa de colonização é em torno de 4% (Regev-Yochay et al., 2004).

A incidência de meningite depende de vários fatores, tais como a faixa etária, a cobertura vacinal e outras condições predisponentes, por exemplo, imunodeficiências específicas (Mcintyre et al., 2012). Na Inglaterra e País de Gales, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram os patógenos mais prevalentes causando meningite bacteriana entre 2004 e 2011 (Okike et al., 2014).

Os principais agentes etiológicos da meningite bacteriana no Brasil são *Neisseria meningitidis* (28%), *S. pneumoniae* (16%) e *Haemophilus influenzae* tipo b (2%), outras bactérias (23%) e bactéria não especificada (31%) (Brasil, 2014).

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Brasil, em 2014, foram confirmados 17.434 casos de meningites. Do total de casos, 34% (n = 5.848) foram registrados como etiologia bacteriana, e destas 16% dos casos foram confirmadas como sendo meningite pneumocócica (n = 947) (SVS, 2014).

Nos Estados Unidos, dados revelaram uma incidência anual de meningite bacteriana de 3 a 6 casos, na França de 2,23 casos todos por 100.000 habitantes (Honda e Warren, 2009; Varon, 2009). Infelizmente, a mortalidade e morbidade da meningite apresenta elevado custo hospitalar. Nos Estados Unidos, a meningite responde por cerca de US\$ 72 mil em internações e até US\$ 1,2 bilhões em custos hospitalares anualmente (Honda e Warren, 2009).

A incidência da meningite bacteriana é maior nos países com baixa renda do que em países desenvolvidos, sendo a taxa de letalidade de 4,5% em países desenvolvidos e de 15 a 50% em países com baixa renda (Brandt, 2010). Aproximadamente 430 milhões de pessoas vivem

na área conhecida como cinturão da meningite, na África subsaariana, que abrange desde o Senegal até Etiópia. Mesmo com o tratamento com antimicrobianos adequados, cerca de 10% dos pacientes morrem e até 20% ficam com sequelas definitivas, como perda auditiva e danos cerebrais (Brouwer et al., 2010).

1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO PNEUMOCOCO

O *S. pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva que pode ser encontrada como um organismo comensal do trato respiratório superior (Martner et al., 2008), sendo a principal causa mundial de pneumonia, bacteremia, otite média e meningite (Harvey et al., 2014) e é o agente patogênico que com maior frequência leva à morte ou a déficits neurológicos de longa duração em comparação com outros patógenos causadores de meningite bacteriana, sendo, dano cognitivo (6,3%), doenças convulsivas (3,7%), perda auditiva (11,2%), déficits motores (8,7%) e alterações comportamentais (6,8%) as deficiências mais frequentes (Edmond et al., 2010).

São conhecidos 93 sorotipos de *S. pneumoniae* identificados de acordo com a composição de seus polissacarídeos capsulares. Diferentes sorotipos podem ter diferentes taxas de virulência, porcentagem de manifestação de doença invasiva em grupos etários diversos e distribuição geográfica (Jauneikaite et al., 2012).

Para que ocorra a colonização na nasofaringe e posterior invasão e disseminação das vias respiratórias inferiores são necessárias a expressão e a interação particular dos fatores de virulência com as células receptoras do hospedeiro (Mook-Kanamori et al., 2011), e quando o micro-organismo alcança a corrente sanguínea pode ocasionar bacteremia, chegando ao sistema nervoso central (SNC) (Ostergaard et al., 2004). Os agentes patogênicos podem infectar o SNC durante a bacteremia ou mais frequentemente ganham acesso direto durante os processos inflamatórios em estruturas adjacentes, por exemplo, 50% de adultos com sinais de meningite pneumocócica tinham sinais de sinusite ou otite (Kastenbauer e Pfister, 2003).

As infecções pneumocócicas são mais frequentes nos extremos de idade com existência de condições consideradas predisponentes como a asplenia anatômica ou funcional, imunodeficiência congênita ou adquirida, desnutrição, síndrome nefrótica, insuficiência renal crônica, transplante de órgãos, diabetes mellitus, doença pulmonar crônica, insuficiência cardíaca congestiva, alcoolismo, hepatopatia crônica,

talassemia, pacientes com fístula liquórica, entre outras (Mook-Kanamori et al., 2011).

O crescimento global e contínuo de cepas resistentes aos antimicrobianos transformou-se em um dos maiores desafios associados a este agente (Cottagnoud e Tauber, 2004). A *S. pneumoniae* possui vários mecanismos de patogenecidade, como cápsula de polissacarídeo, pneumolisina, hialuronidase, lipoproteínas e proteínas de superfície (Mitchell et al., 2010).

A cápsula de polissacarídeo é, considerada como o fator de virulência mais importante do pneumococo, exercendo atividade antifagocitária, já que impede a célula bacteriana de interagir com os receptores das células fagocitárias do hospedeiro, mantendo o micro-organismo fora da célula (Tortora et al., 2012). A cápsula também é crucial para a colonização, impede a remoção mecânica pelo muco (Nelson et al., 2007), e também restringe a autólise e pode reduzir a exposição a antibióticos (Van Der Poll e Opal, 2009; Tortora et al., 2012).

A pneumolisina é uma toxina expressa por quase todas as cepas invasivas do *S. pneumoniae*, sendo responsável por ações citotóxicas e pró-inflamatórias, diminuição do batimento ciliar epitelial, ativação do sistema complemento, apoptose de células do hospedeiro e citólise (Mook-Kanamori et al., 2011). Essa toxina possui a capacidade de ligar-se a membrana do colesterol das células e formar grandes poros e destruindo, assim, a integridade da membrana e levando a morte celular (Tortora et al., 2012). O papel da pneumolisina na patogênese de infecções tem sido estudado em modelo animal usando pneumococos em que o gene para a toxina foi suprimido (Mitchell e Mitchell, 2010). As primeiras experiências com estirpes *knockout* para pneumolisina mostraram que a falta da toxina reduz a virulência do micro-organismo nas vias de infecção intranasal e sistêmica (Berry et al., 1989).

Algumas exoglicosidases (por exemplo: neuraminidase A, β -galactosidase A e neuraminidase B) são conhecidas por estarem envolvidas na interação das adesinas com o tecido glicoconjugado do hospedeiro (King et al., 2006) e por quebrarem o muco, diminuindo sua viscosidade e impedindo o seu aprisionamento (Mook-Kanamori et al., 2011). A clivagem do ácido n-acetilneuramínico de glicolipídeos, lipoproteínas e oligossacarídeos nas superfícies das células e em fluidos corporais pela neuraminidase, pode causar danos diretos ao hospedeiro (Mitchell e Mitchell, 2010).

Enzimas como N-acetilglucosamina-deacetilase e O-acetiltransferase geram resistência à lisozima secretada pelo hospedeiro

(Sellner et al., 2010). A produção de imunoglobulina A protease (IgA1) quebra as moléculas de IgA secretadas impedindo a sua opsonização (Price e Camilli, 2009). O peróxido de hidrogênio produzido pelo *S. pneumoniae* também pode ser fator causador de estresse oxidativo tissular (Tortora et al., 2012). Diversas proteínas como a PspC encontram-se na parede celular e tem a capacidade de ligar-se ao componente C3b, prevenindo a opsonização (Mook-Kanamori et al., 2011). A produção de biofilme pelo pneumococo foi estudada por Moscoso e colaboradores e parece ser mais uma estratégia utilizada pelo micro-organismo criando um meio ambiente protegido que impede a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Moscoso et al., 2009).

1.4 FISIOPATOLOGIA DA MENIGITE BACTERIANA

A invasão neurológica bacteriana pode ocorrer tanto no contexto da doença sistêmica após disseminação pela corrente sanguínea ou por extensão de uma sinusite ou otite. A invasão bacteriana do SNC também é possível através de infecções locais, má formação na dura-máter, após neurocirurgia ou trauma crânio-cervical (Sellner et al., 2010).

Após a utilização de seus diversos mecanismos de virulência para burlar as barreiras naturais do hospedeiro, o pneumococo prende-se ao epitélio da nasofaringe através da ligação da fosforilcolina ao fator de ativação de plaquetas (PAF) ou pela ligação da proteína ligadora de colina com o receptor epitelial polimérico de imunoglobulina, posteriormente, a bactéria atravessa o endotélio por mecanismos inter e pericelular (Mook-Kanamori et al., 2011).

No SNC, o pneumococo novamente pode utilizar-se da interação entre a fosforilcolina da sua parede celular com o receptor PAF, atravessando a barreira hemetoencefálica (BHE) através do mecanismo transcelular ou causando o rompimento das junções apertadas e atravessando por via intercelular (Barichello et al., 2012b). Após a invasão do SNC, *S. pneumoniae* multiplica-se rapidamente e ao mesmo tempo ocorre lise bacteriana, liberando produtos bacterianos como ácido lipoteicóico, pneumolisina e outros fragmentos da parede celular (Mook-Kanamori et al., 2011; Barichello et al., 2012b). Esses produtos bacterianos, conhecidos como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Sellner et al., 2010), são reconhecidos pelas células do sistema imune inato (Annane et al., 2005). Os PAMPs são reconhecidos por três famílias de receptores específicos de reconhecimento padrão (PRRs), os receptores Toll-likes (TLRs), os

adaptadores de proteínas intracelulares conhecidas como domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) e as proteínas de reconhecimento de peptídeoglicanos presentes na superfície das células hospedeiras (Savva e Roger, 2013).

Após o reconhecimento dos PAMPs, inicia-se a sinalização intracelular, através da transmissão de sinal do domínio citoplasmático do TLR, denominado receptor de domínio homólogo Toll-IL-1 (TIR), para o receptor de interleucina-1 associado à quinase 4 (IRAK-4), sendo este ativado (Cohen, 2002). A ativação de IRAK-4 é facilitada pela proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88). O IRAK-4 que estimula então, o fator associado ao fator de necrose tumoral (TRAF) e, por conseguinte, o fator associado ao fator de necrose tumoral quinase (TRAK) (Annane et al., 2005). Como resultado, o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é liberado e, se desloca para o núcleo da célula. As ações do NF- κ B incluem ligação ao DNA, ativando assim centenas de genes específicos que promovem a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina (IL) 1 β e também moléculas anti-inflamatórias como a IL-10 (Zingarelli, 2005) (figura 1).

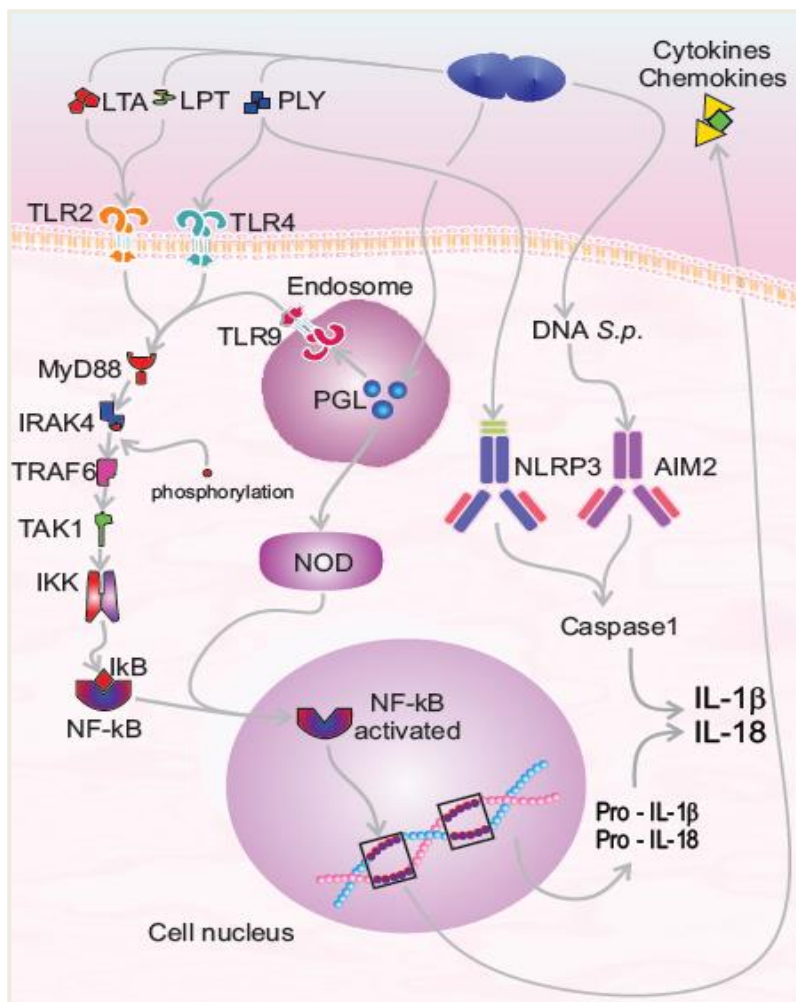


Figura 1: Fisiopatologia do *S. pneumoniae* no SNC: aderência, invasão e resposta do hospedeiro adaptado de Barichello et al., 2012.

Devido à produção de citocinas, leucócitos polimorfonucleares são atraídos e ativados e, conseqüentemente, grandes quantidades de espécies reativas ao oxigênio (ERO) são produzidas (Kastenbauer et al., 2002). Um sulfatado de glicoproteínas presente na superfície dos leucócitos chamado, sialil-Lewis^x liga-se as selectinas P e E das células endoteliais. Esta ligação torna-se mais forte quando CXCL-8 liga-se ao seu receptor específico nos neutrófilos. As citocinas pró-inflamatórias,

como o $\text{TNF-}\alpha$, também são necessárias para induzir a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e ICAM-2. A ligação entre as células endoteliais e ICAM-1 permite a passagem de neutrófilos em direção ao gradiente de substâncias quimioatraentes (Hanna e Etzioni, 2012). Isso leva a formação de estresse oxidativo, produção e liberação de citocinas e quimiocinas, aumento da ativação de neutrófilos, peroxidação lipídica, danos ao DNA, nitração de tirosina, a ativação de metaloproteínases de matriz e produção de prostaglandina (Klein et al., 2006) (figura 2).

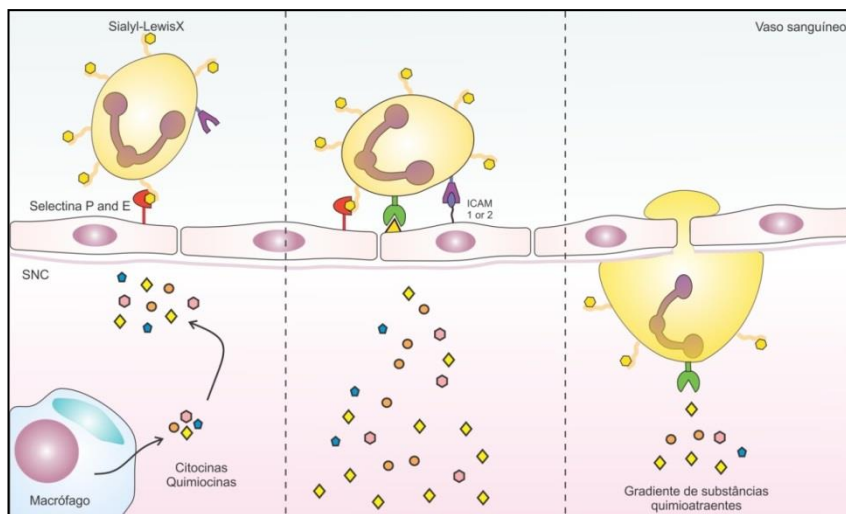


Figura 2: Migração de leucócitos, adaptado de Barichello et al., 2013.

1.5 CITOCINAS E QUIMIOCINAS

As citocinas são pequenas proteínas liberadas por várias células como macrófagos, neutrófilos, leucócitos, microglias e astrócitos, geralmente em resposta a um estímulo ativador e induzem respostas por meio da ligação a receptores exclusivos (Mook-Kanamori et al., 2011). Além disso, podem atuar de forma autócrina, afetando o desempenho das células que liberam as citocinas, ou de forma parácrina, afetando o comportamento das células adjacentes. Algumas citocinas são suficientemente estáveis para agir de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isso dependa de sua habilidade de penetrar na circulação e de sua meia-vida sanguínea (Janeway e Travers, 2014).

A proliferação de bactérias no interior do espaço subaracnóide estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Tortora et al., 2012). Muitas células do cérebro, tais como células endoteliais, células gliais e macrófagos podem produzir TNF- α , IL-1 β e IL-6 em resposta a estímulos bacterianos (Sellner et al., 2010). Em condições patológicas, como inflamações agudas, crônicas ou dano tecidual, o sistema imune é ativado e ocorre um aumento da produção de macrófagos e liberação de citocinas, como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Janeway e Travers, 2014).

O TNF- α é uma citocina importante na resposta pró-inflamatória precoce e é considerada uma molécula pró-inflamatória que aumenta a resposta imune para acelerar a eliminação do patógeno e uma melhor eficácia do processo inflamatório (Sellner et al., 2010). O aumento dos níveis de TNF- α estão relacionados à perturbações na BHE e sequelas neurológicas em pacientes com meningite (Barichello et al., 2012a). O TNF- α possui diversos efeitos, incluindo citotoxicidade, atividade antiviral e ativação do fator de transcrição e regulação da resposta imune. Além disso, o TNF- α estimula a liberação de IL-1 β no SNC, o que também é essencial para a produção de IL-6 (Janeway e Travers, 2014).

As citocinas, TNF- α e IL-1 β , agem no endotélio celular para induzir a expressão de moléculas de adesão que desaceleram leucócitos circulantes e fazendo se aderirem à parede vascular (Izadpanah et al., 2014). Em paralelo, TNF- α e IL-1 β , também estimulam macrófagos e células endoteliais dos tecidos a expressar quimiocinas que atraem leucócitos para o local da lesão ou infecção (Zingarelli, 2005).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória com a capacidade de induzir grande quantidade de genes geralmente não expressos em estados normais de saúde, e aumenta a expressão de outras citocinas, tais como o TNF- α , IL-6 e quimiocinas bem como moléculas de adesão (Janeway e Travers, 2014). Essa citocina age como estimulante de medula óssea aumentando o número de células progenitoras mielóides e promovendo a liberação de neutrófilos, resultando em neutrofilia (Dinarello, 2005).

A IL-6 é uma proteína pró-inflamatória produzida durante a resposta de fase aguda a estímulos, como trauma, insulto cirúrgico ou infecção (Rincon, 2012). A IL-6 é responsável pelo estímulo da síntese de hormônio adrenocorticotrófico na glândula pituitária, induz a síntese de fator de crescimento do nervo (Janeway e Travers, 2014), podendo também regular o crescimento e desenvolvimento de células

hematopoiéticas e células-tronco embrionárias (Song e Kellum, 2005). A expressão de IL-6 no SNC é necessária para a resposta da febre após injeção periférica de lipopolissacarídeo (LPS) ou IL-1 β (Takahashi et al., 2014), também sendo responsável pela astrogliose e ativação da microglia (Rincon, 2012).

A citocina quimiotática indutora de neutrófilos-1 (CINC-1) é uma quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o SNC e está implicada na filtração de células inflamatórias para o parênquima cerebral, podendo também atuar como uma proteína de fase aguda após dano cerebral (Janeway e Travers, 2014). A quimiocina CINC-1 é para o rato o equivalente à citocina IL-8 para humanos, a IL-8 está envolvida na regulação e crescimento em seres humanos, e sua elevada expressão está associada a uma gama de doenças inflamatórias (Abdelmoez et al., 2014).

Uma lesão aguda no cérebro, como traumatismo ou insulto isquêmico resulta em uma resposta inflamatória aguda (Del Zoppo et al., 2000), e os componentes desta resposta inflamatória, incluem o recrutamento de leucócitos e a liberação de mediadores inflamatórios para o local, que pode exacerbar a lesão cerebral (Janeway e Travers, 2014). As citocinas, como IL-1 β , podem induzir a degeneração em neurônios comprometidos pela lesão inicial (Maxeiner et al., 2014). A elevada expressão das proteínas CINC-1 também foi avaliada no SNC de roedores (Barichello et al., 2012d), bem como, em acidente vascular cerebral e na periferia em resposta a lesão aguda e crônica (Yamada et al., 2000) (figura 3).

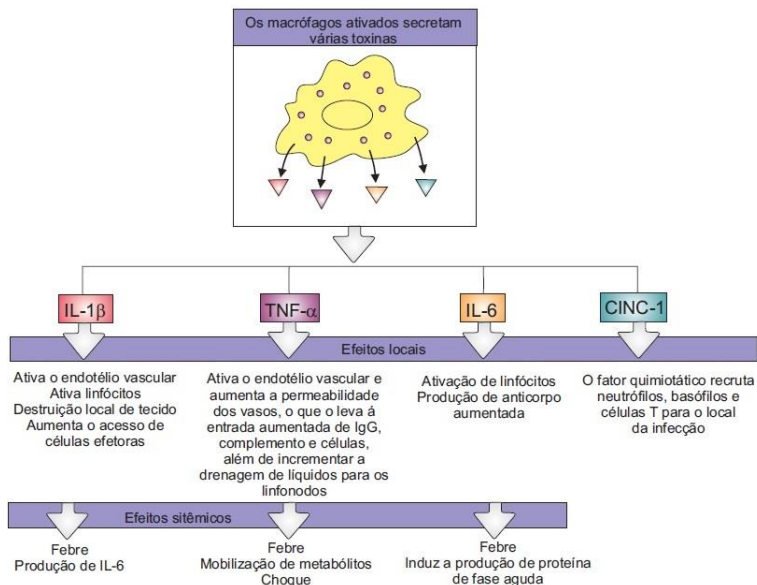


Figura 3: Representação das principais citocinas secretadas pelos macrófagos em resposta a produtos bacterianos. Adaptada de Janeway e Travers 2014.

1.6 FATOR NEUROTROFICO DERIVADO DO CÉREBRO (BDNF)

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é um membro das neurotrofinas e o mais difundido fator de crescimento no cérebro, exercendo efeitos na transmissão sináptica, estimulação neurogênica e parece estar envolvido em processos de plasticidade sináptica. O hipocampo é descrito como um importante sítio de ação do BDNF (Binder e Scharfman, 2004).

Essa neurotrofina vem sendo pesquisada em diversas doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, pois desempenha um papel fundamental na plasticidade neuronal e memória, modula os principais processos dependentes de estímulo externo, isto é, aprendizado, experiências e memórias (Frey et al., 2006a). É uma proteína responsável pelo processo de neurogênese, atua na capacidade que o SNC possui em modificar algumas das suas propriedades morfológicas e funcionais em resposta a alterações, incluindo influência do meio ambiente, estado emocional, nível cognitivo (Huang et al., 2008; Sen et al., 2008).

Em um estudo de Barichello e colaboradores (2010) foi evidenciado uma correlação entre os baixos níveis de BDNF e a presença de déficits comportamentais em animais submetidos à meningite neonatal (Barichello et al., 2010a).

A utilização de BDNF exógeno mostrou ser eficaz na neuroproteção em ratos submetidos à meningite bacteriana experimental, sendo postulado que este mediador poderia estar envolvido na homeostase do cálcio neuronal, na prevenção da morte celular pela modulação de ERO e por apoptose (Li et al., 2007).

1.7 CANABIDIOL

Os canabinóides são componentes da planta *Cannabis sativa* conhecidos por sua potente ação anti-inflamatória, imunomoduladora e analgésica através da ativação de receptores localizados no SNC e em células do sistema imune. A caracterização química dos principais canabinóides, Δ^9 -tetrahidrocanabinol (Δ^9 -THC) e canabidiol (CBD), presentes nesta planta pelo grupo de Mechoulam na década de 1960 originou a primeira onda de interesse científico nestes compostos (Gaoni e Mechoulam, 1964).

O CBD é o principal componente não psicotrópico da planta *C. sativa*, constituindo até 40% do seu extrato. Com a descoberta do sistema endocanabinóide no início de 1990 (Devane, 1994) houve um interesse renovado no CBD, com o número de estudos crescendo exponencialmente desde então (Campos et al., 2012) devido à descoberta de sua atividade antioxidante, anti-inflamatória (Saito et al., 2012; Mecha et al., 2013) e neuroprotetora (Izzo et al., 2009) (figura 4).

O CBD pode exercer ação terapêutica em diversas condições que envolvem inflamação e estresse oxidativo, incluindo doença de Parkinson, diabetes, artrite reumatóide, Alzheimer e a lesão de isquemia-reperfusão (Booz, 2011). Alguns autores sugerem que este composto é um dos candidatos mais promissores na terapêutica numa vasta gama de doenças (Izzo et al., 2009; Hill et al., 2012). O CBD diminuiu a produção de citocinas inflamatórias e a ativação de células microgliais em modelo animal de esclerose múltipla e cultura de células da microglia, respectivamente (Kozela et al., 2010; Kozela et al., 2011) e também preservou a circulação cerebral em modelo de isquemia em camundongos e atenuou as alterações vasculares em modelo de encefalopatia relacionada à sepse (Mishima et al., 2005; Lafuente et al., 2011). Os efeitos de proteção do CBD em um modelo de ratos de lesão

cerebral induzida por compulsão de etanol (Hamelink et al., 2005) no modelo animal de doença de Parkinson foram atribuídos às suas propriedades antioxidantes (Garcia-Arencibia et al., 2007) (Figura 4).

O sistema endocanabinóide compreende os receptores acoplados à proteína G, CB1 e CB2, localizados no SNC e periférico e os seus ligantes lipídicos à base de araquidonato, por exemplo, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e anandamida (N-araquidonoiletanolamina) e as enzimas que sintetizam e degradam esses ligantes (Tanasescu e Constantinescu, 2010). Os macrófagos, microglia e osteoclastos, expressam ambos os receptores canabinóides (Graham et al., 2009).

No SNC, este sistema influencia a comunicação sináptica e modula o apetite, ansiedade, aprendizagem e memória e o crescimento e desenvolvimento (Alger e Kim, 2011).

O CBD pode modular a função do sistema imune e estas ações podem ser variadas e dependentes da concentração, mas, em geral, incluem a supressão de imunidade mediada por células e imunidade humoral e envolve a inibição da proliferação, maturação, migração de células do sistema imunológico, apresentação de antígenos e a resposta humoral (Pertwee, 2008). Na maior parte dos modelos experimentais *in vivo* de inflamação, o CBD atenuou a migração e infiltração de células inflamatórias, como neutrófilos (Mchugh et al., 2008).

O CBD bloqueou a ativação imediata da NADPH oxidase, bem como formação de ERO e da secreção de TNF- α . No entanto, uma compreensão completa das ações anti-inflamatórias do CBD em células microgлияis não se encontra ainda disponível. Recentemente, através de um mecanismo não identificado, o CBD suprimiu a sinalização pró-inflamatória induzida por LPS em cultura de células microgлияis, incluindo a ativação de NF-kB e STAT1, enquanto melhorou a sinalização anti-inflamatória relacionada com a STAT3 (Kozela et al., 2010).

A inflamação e estresse oxidativo estão intimamente envolvidos na gênese de muitas doenças inflamatórias, como sepse e meningite. Diante disso o CBD parece ser uma estratégia terapêutica promissora pelo seu efeito antioxidante e ações anti-inflamatórias em células do sistema imunológico, como macrófagos e microglia. O CBD também tem a vantagem de não ter efeitos colaterais psicotrópicos.

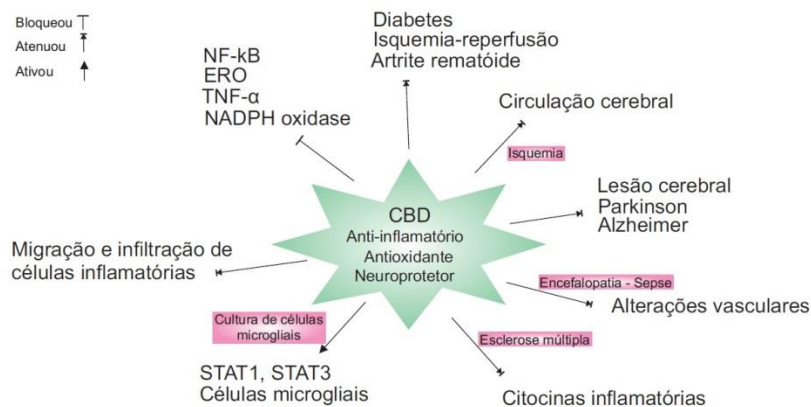


Figura 4: Potenciais terapêuticos do CBD. Figura elaborada pelo autor.

1.8 JUSTIFICATIVA

O modelo animal experimental de meningite pneumocócica com suas limitações continua a proporcionar a compreensão da fisiopatologia desta complexa doença e propõe novas terapias adjuvantes. Desta forma, o tratamento com CBD pode promover alterações estruturais e funcionais no SNC, aumentando a expressão de proteínas sinápticas, plasticidade sináptica e neurogênese, além de promover um efeito anti-inflamatório podendo diminuir os danos causados pela meningite, sendo um possível novo adjuvante terapêutico.

Apesar dos significativos avanços no tratamento, a meningite bacteriana em adultos permanece como uma das mais graves doenças infecciosas do SNC, com alta taxa mortalidade e morbidade. Desta forma torna-se importante avaliar novas terapias coadjuvantes na tentativa de minimizar os danos ocasionados por esta infecção.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tratamento coadjuvante do canabidiol como fator neuroprotetor em ratos Wistar adultos submetidos à meningite pneumocócica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e CINC-1 em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 6 horas após indução da meningite pneumocócica e tratados com canabidiol.

- Avaliar os níveis de BDNF em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 6 horas após indução da meningite pneumocócica e tratados com canabidiol.

- Avaliar a memória e a aprendizagem em ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite pneumocócica tratados com canabidiol através do teste de esquiva inibitória, habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos.

- Avaliar os níveis de TNF- α e BDNF em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite pneumocócica e tratados com canabidiol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia Experimental e Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, Criciúma, SC, Brasil. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC 97/2012 (anexo).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram utilizados para o estudo 120 ratos Wistar machos adultos, com peso corporal de 250 a 300 g provenientes do Biotério da UNESC, onde permaneceram alojados em local fresco e arejado em um ciclo de 12 horas claro/escuro, a uma temperatura de 23 °C +/- 1 °C, com alimento e água sempre disponíveis.

Foram excluídos do estudo os animais que apresentaram qualquer má-formação aparente; peso inferior ou superior aos mencionados anteriormente, animais que eventualmente morreram durante o experimento, antecedendo o tempo de eutanásia dos animais.

3.3 ORGANISMO INFECTANTE

S. pneumoniae, sorotipo III, proveniente do Instituto Adolfo Lutz, foi cultivado durante a noite em 10 mL de caldo Todd Hewitt, diluída em meio fresco e crescidas até a fase logarítmica. A cultura foi centrifugada durante 10 min a 5000 x g e novamente suspensa em solução salina estéril até a concentração de 5×10^9 UFCol/mL (Grandgirard et al., 2007b).

3.4 PROTOCOLO PARA INDUÇÃO DA MENINGITE

Foram utilizados Ratos Wistar machos (250-350 g de peso corporal), provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Todos os procedimentos cirúrgicos e inoculações bacterianas foram realizadas sob anestesia, composta de uma administração via intraperitoneal (i.p) de cloridrato de cetamina (6,6

mg/kg) e cloridrato de xilazina (0,3 mg/kg) (Hoogman et al., 2007; Barichello et al., 2010d).

Os animais foram submetidos a uma punção na cisterna magna com uma agulha número 23 e receberam 10 µL de LCR artificial como um placebo ou volume equivalente de suspensão bacteriana de *S. pneumoniae*. No momento da inoculação, os animais receberam reposição volêmica e foram devolvidos às suas gaiolas (Irazuzta et al., 2008; Barichello et al., 2010d). Dezoito horas após a indução, a meningite foi confirmada por uma cultura quantitativa de 5 µL de LCR obtido por punção da cisterna magna (Barichello et al., 2010d; Barichello et al., 2014).

3.5 TRATAMENTO E MODELO EXPERIMENTAL

3.5.1 Protocolo para avaliação dos parâmetros inflamatórios

O CBD (THC-Pharm, Frankfurt, Germany, and STI-Pharm, UK) foi preparado imediatamente antes do uso, em monooleato de polioxietilenossorbitano (Tween 80) salina a 2%.

Para análise dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e BDNF, o CBD foi administrado, em dose única imediatamente após a indução da meningite, nas doses de 2,5 mg/kg; 5 mg/kg e 10 mg/kg (i.p) (Zuardi et al., 2006). Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais grupo: controle/salina; meningite/salina; meningite/CBD 2,5 mg/kg; meningite/CBD 5 mg/kg; meningite/CBD 10 mg/kg, com um n de 6 animais por grupo, totalizando 30 animais. Os animais foram mortos por decapitação seis horas após a indução da meningite e as estruturas cerebrais hipocampo e córtex pré-frontal foram retiradas e armazenadas a -80 °C para posterior análise de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e BDNF (figura 4).

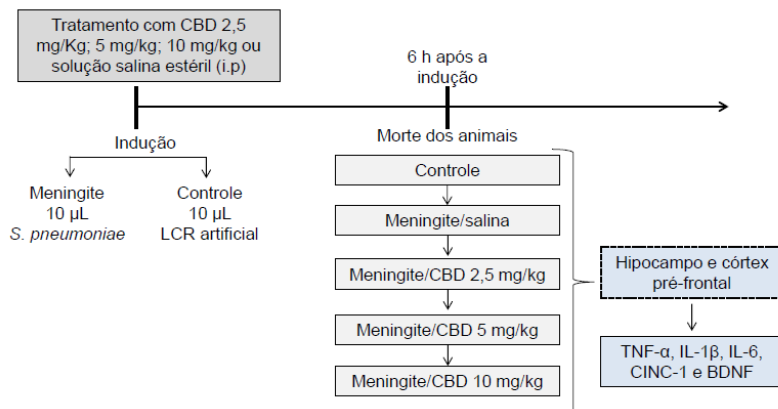


Figura 5: Representação do tempo de indução da meningite, tratamento com CBD e a morte dos animais para avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e BDNF. Figura elaborada pelo autor.

3.5.2 Protocolo para realização dos testes comportamentais

Para a realização do teste comportamental de esQUIVA inibitória, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, controle/salina; meningite/salina; meningite/CBD 2,5 mg/kg; meningite/CBD 5 mg/kg; meningite/CBD 10 mg/kg, com um n de 10 animais por grupo, totalizando 50 animais para este teste comportamental. Para a realização dos testes comportamentais de habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos novos animais foram divididos em grupo controle/salina, controle/CBD 10 mg/kg, meningite/salina e meningite/CBD 10 mg/kg, com um n de 10 animais por grupo, totalizando 40 animais para estes dois testes comportamentais, no total de três testes comportamentais foram utilizados 90 ratos. Todos os animais receberam uma dose diária de CBD durante nove dias. Dezoito horas após a indução da meningite e após a confirmação da mesma, os animais receberam a primeira dose de antimicrobiano ceftriaxona/Rocefin® La Roche, Brasil 100 mg/kg (i.p) de 12 em 12 h durante sete dias. No décimo dia após a indução da meningite os animais foram submetidos aos testes comportamentais e em seguida foram mortos e as estruturas hipocampo e córtex pré-frontal foram retiradas e armazenadas em -80° C para posterior dosagem de TNF- α e BDNF (figura 5).

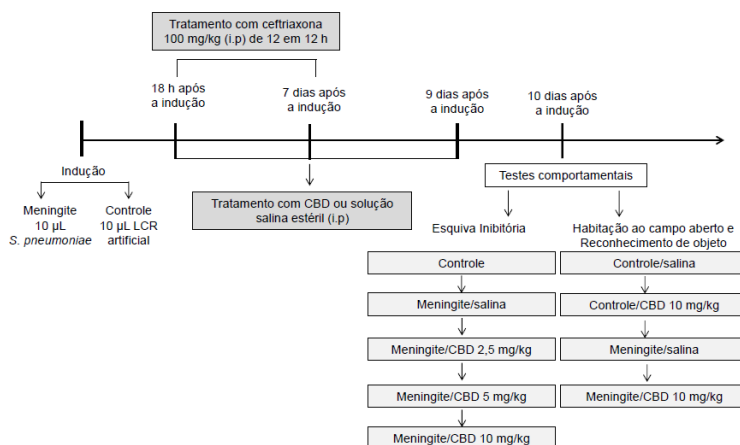


Figura 6: Representação do tempo de indução da meningite, tratamento com ceftriaxona e CBD e morte dos animais para realização dos testes comportamentais. Figura elaborada pelo autor.

3.6 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

3.6.1 Citocinas, quimiocinas e BDNF

Os animais foram mortos por decapitação e as estruturas hipocampo e córtex pré-frontal foram imediatamente isoladas e armazenadas a -80°C para posterior análise dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, IL-4, IL-6, CINC-1 e BDNF.

As estruturas foram homogeneizadas em solução de extração (100 mg de tecido por 1 mL) contendo: 0,4 mol/L de NaCl, 0,05% de Tween 20, 0,5% de BSA, 0,1 mmol/L de fluoreto de fenil metil sulfonil, 0,1 mmol/L de cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de EDTA e 20 de KI a aprotinina, utilizando Ultra-Turrax (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). O homogenato de cérebro foi centrifugado a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C , e os sobrenadantes foram recolhidos e armazenados a -20°C . A concentração de citocinas e quimiocina foi determinada utilizando a metodologia de enzima e um ensaio de ELISA. Os sobrenadantes do tecido cerebral foram dosados em uma configuração de ELISA utilizando anticorpos comercialmente disponíveis, de acordo com os procedimentos fornecidos pelo fabricante (R & D Systems,

Minneapolis, MN). Os níveis de BDNF foram avaliados como descrito anteriormente (Frey et al., 2006b), utilizando o ensaio de sanduíche imunoenzimático, utilizando-se kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Chemicon, EUA). Os resultados foram mostrados em pg/mg de tecido cerebral.

3.7 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.7.1 Esquiva Inibitória

O teste de esquiva inibitória foi realizado em um aparato que consiste em uma caixa de acrílico medindo 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo piso é formado por barras paralelas de aço inoxidável (diâmetro de 1 mm) espaçadas em uma distância de 1 cm. Uma plataforma com 7 cm de largura e 2,5 cm de comprimento foi colocada junto à parede esquerda do aparelho (figura 6). Na sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e o tempo que estes levaram para descer sobre as grades com as quatro patas foi medida com um dispositivo automático. Imediatamente após tocarem com as quatro patas na grade, os animais receberam um choque de 0,4 mA durante 2 segundos e voltaram à sua gaiola de origem. A sessão teste foi realizada 24 h após o treinamento (memória de longo prazo).

Na sessão de teste, o animal foi novamente colocado na plataforma e medido o tempo que ele levou para descer (latência), porém não foi aplicado o choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória (Izquierdo et al., 1998; Bevilaqua et al., 2003). O teste de esquiva inibitória avalia a memória aversiva do animal. O aparato e os procedimentos têm sido descritos em estudos anteriormente publicados (Quevedo et al., 1997; Roesler et al., 2003).

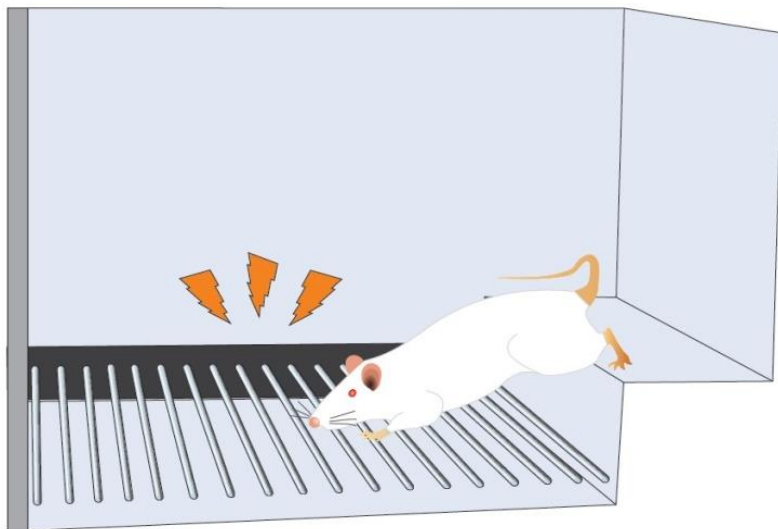


Figura 7: Teste de esquia inibitória. Figura elaborada pelo autor.

3.7.2 Habituação ao campo aberto

O comportamento foi avaliado no aparato de campo aberto, a fim de avaliar as duas atividades locomotoras e exploratórias. O aparato mede 40×60 centímetros de campo aberto cercado por 50 centímetros de parede feitas de madeira com um vidro frontal (Figura 7). O piso do campo aberto é dividido em 9 retângulos por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrante traseiro esquerdo e, em seguida, deixados sozinhos para explorar a arena por cinco minutos (sessão treino). Imediatamente após este procedimento, os animais foram levados de volta para a sua gaiola moradia e 24 horas após eles foram submetidos a uma nova sessão no aparelho de campo aberto (sessão de teste). Durante 5 minutos, em ambas as sessões, foram observadas e documentadas todas as vezes que o animal atravessava as linhas pretas demarcadas ou realizava atividade exploratória através de levantamentos. A diminuição do número de cruzamentos (crossings) e levantamentos (rearings) entre as duas sessões foi tomado como uma medida da retenção de memória de habituação (Vianna et al., 2000).

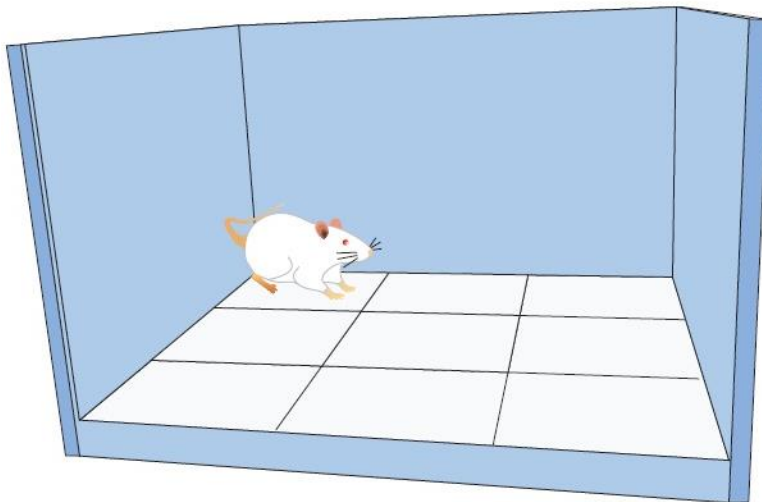


Figura 8: Teste de habituação ao campo aberto. Figura elaborada pelo autor.

3.7.3 Reconhecimento de Objetos

Esta tarefa avalia a memória não-aversiva e não-espacial. A tarefa foi realizada em um aparato de campo aberto de 40 x 60 centímetros aberto rodeado por paredes de 50 cm de altura feitas de madeira com uma parede de vidro frontal. O piso do campo aberto foi dividido em 9 retângulos iguais por linhas pretas (Figura 8). No primeiro dia todos os animais foram submetidos a uma sessão de habituação em que se permitiu explorar livremente o campo aberto durante 5 minutos. Nenhum objeto foi colocado na caixa durante o processo de habituação. O número total de cruzamentos das linhas pretas e levantamentos realizados nesta sessão foram avaliados como locomoção e atividade exploratória, respectivamente. No segundo dia o treino foi realizado colocando os ratos individualmente durante 5 min no campo, em que dois objetos idênticos (objetos A1 e A2) foram posicionados em dois cantos adjacentes, a 10 cm de distância das paredes. No terceiro dia foi realizado o teste de memória de longo prazo, realizado 24 horas após o treino, os mesmos ratos foram submetidos à uma nova exploração do campo, durante cinco minutos na presença do objeto familiar A e de um novo objeto B. Um índice de reconhecimento calculado para cada

animal é relatado como a razão $TB/(TA + TB)$ (TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A; TB = tempo gasto explorando o objeto novo B). Exploração foi definida como sniffing (explorar o objeto 3-5 cm de distância a partir dele) ou tocar o objeto com o nariz e/ou patas dianteiras (De Lima et al., 2005).

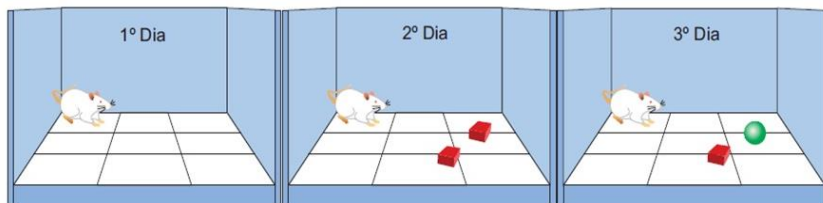


Figura 9: Teste de reconhecimento de objetos. Figura elaborada pelo autor.

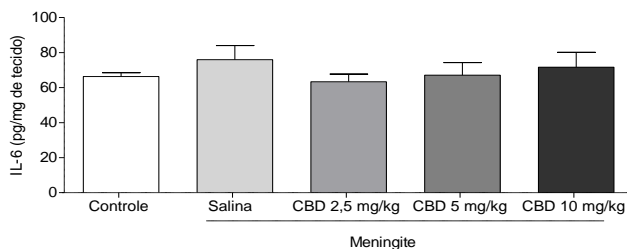
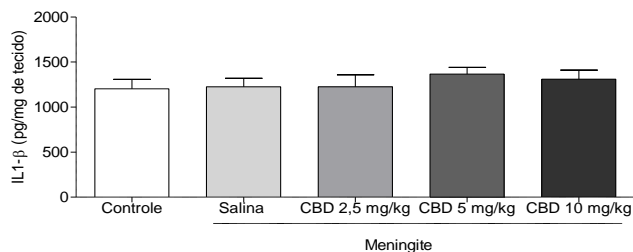
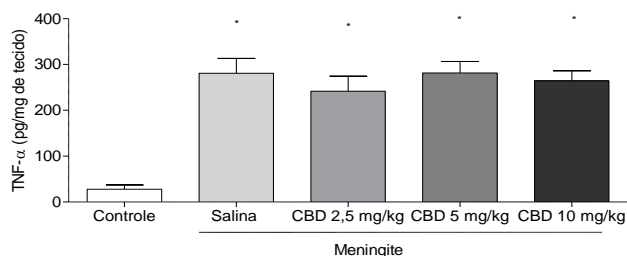
3.8 ESTATÍSTICA

Dados de citocinas, quimiocina e BDNF foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 6 animais por grupo. As diferenças de cada grupo foram avaliadas através da análise da variância (ANOVA), seguido do *post-hoc* de Tukey.

Dados da tarefa de esquivas inibitória e Reconhecimento de objetos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. Dados da tarefa de habituação ao campo aberto serão relatados como média \pm EPM, e as comparações dentro os grupos foram feitas utilizando teste *t* de Student pareado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20.0 foi utilizado para análises estatísticas.

4 RESULTADOS

A figura 10 demonstra os efeitos do CBD sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e BDNF no hipocampo seis horas após a indução da meningite pneumocócica em ratos Wistar adultos. Os níveis de TNF- α e CINC-1 foram aumentados em todos os grupos meningites tratados ou não com CBD comparados ao grupo controle, demonstrando que o tratamento com CBD não preveniu o aumento dessas citocinas. Os níveis de IL-1 β , IL-6 e BDNF não apresentaram diferença significativa entre os grupos.



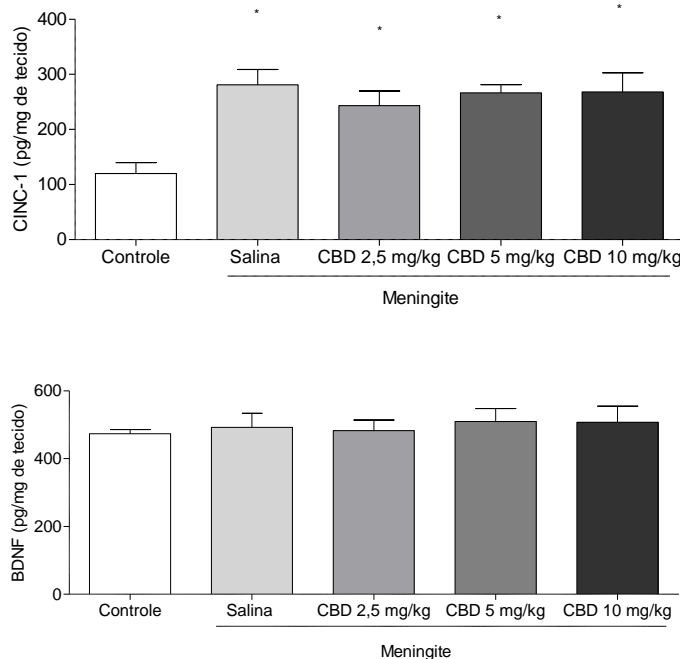


Figura 10: Avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, CINC-1 e BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos 6 horas após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os resultados foram apresentados em média \pm EPM de 6 animais por grupo. As diferenças de cada grupo foram avaliadas através de ANOVA, seguido do *post-hoc* de Tukey. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle.

A figura 11 demonstra os efeitos do CBD sobre os níveis de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CINC-1 e BDNF no córtex pré-frontal seis horas após a indução da meningite em ratos Wistar adultos. Os níveis de TNF- α e CINC-1 foram aumentados em todos os grupos meningítes tratados ou não com CBD. Os níveis de IL-1 β , IL-6 e BDNF não apresentaram diferença significativa.

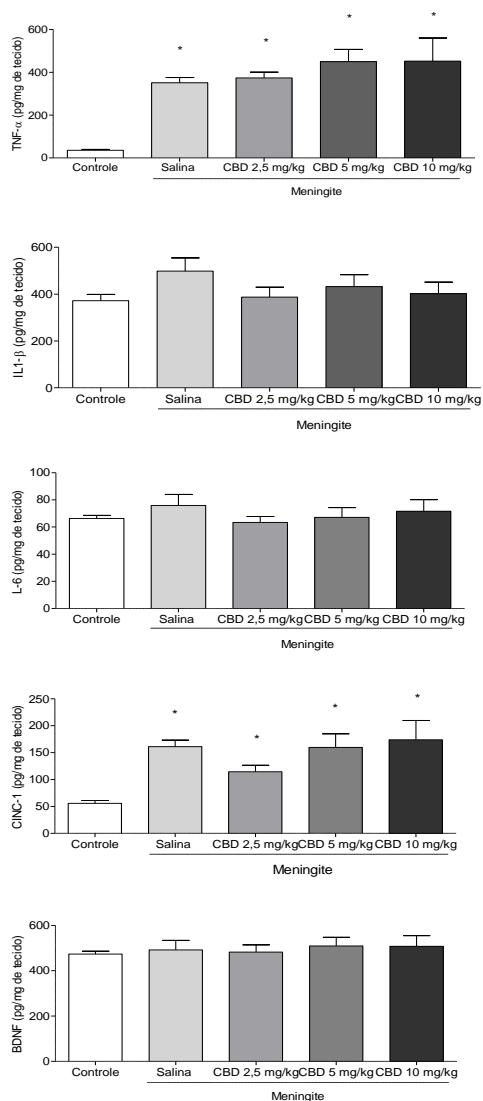


Figura 11: Avaliação dos níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6, CINC-1 e BDNF no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 6 horas após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os resultados foram apresentados em média \pm EPM de 6 animais por grupo. As diferenças de cada grupo foram avaliadas através de ANOVA, seguido do *post-hoc* de Tukey. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle.

Dez dias após a indução da meningite os animais foram submetidos aos testes comportamentais. Na figura 12, observa-se o resultado do teste de esquiiva inibitória, os grupos meningite tratados com salina; 2,5 mg/kg e 5 mg/kg de CBD não apresentaram diferença no tempo de latência entre a sessão treino e a sessão teste, demonstrando dano de memória aversiva. Entretanto, o grupo meningite tratado com 10 mg/kg de CBD apresentou diferença significativa no tempo de latência entre a sessão treino e a sessão teste, demonstrando prevenção de memória aversiva.

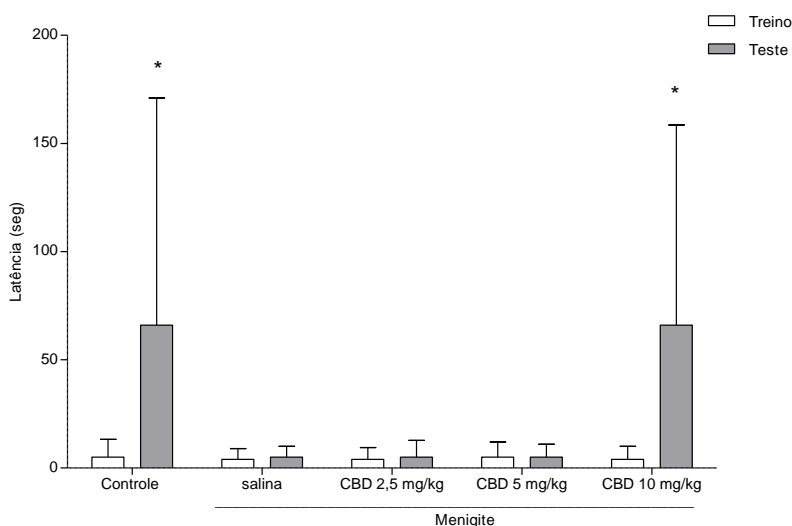


Figura 12: Teste de esquiiva inibitória 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Dados do teste de esquiiva inibitória foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado a sessão treino.

No teste comportamental de habituação ao campo aberto, figura 13, no grupo meningite não houve diferença no número de cruzamentos e levantamentos entre a sessão treino e a sessão teste, sugerindo prejuízo

de memória de habituação. No grupo controle, controle tratado com CBD e meningite tratado com CBD houve diferença estatística no número de cruzamentos e levantamentos entre a sessão treino e a sessão teste, demonstrando memória de habituação nestes grupos.

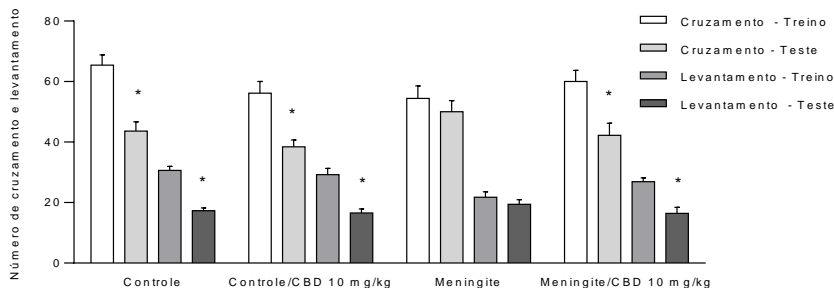


Figura 13: Teste de habituação ao campo aberto 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Dados do teste de habituação ao campo aberto foram relatados como média \pm EPM, de 10 animais por grupo e as comparações dentro os grupos foram feitas utilizando teste *t* de Student pareado. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado a sessão treino.

Na figura 14, observa-se o resultado do teste comportamental de reconhecimento de objetos, os animais do grupo meningite apresentaram prejuízo de memória de reconhecimento do objeto, ou seja, não utilizaram um tempo significativamente maior explorando o objeto novo, apresentando perda de memória de longo prazo. No entanto, os animais do grupo controle, controle tratado com CBD e meningite tratado com CBD apresentaram memória de longo prazo durante as sessões teste em comparação com a sessão treino.

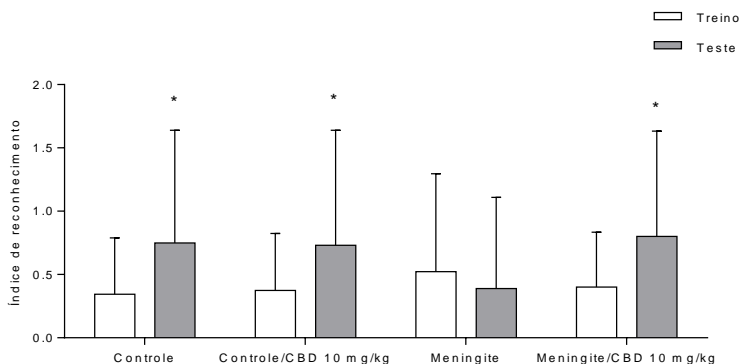


Figura 14: Teste de reconhecimento de objeto 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Dados do teste de reconhecimento de objetos foram apresentados como mediana e intervalo interquartil, de 10 animais por grupo e as comparações entre os grupos foram analisadas utilizando-se o teste U Mann-Whitney. As comparações dentro de cada grupo foram realizadas pelo teste de Wilcoxon. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado a sessão treino.

A figura 15 mostra os níveis de TNF- α e BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Foi observado que nos grupos meningite não houve alteração nos níveis de TNF- α e BDNF, não demonstrando efeito do CBD sobre estes parâmetros 10 dias após a indução da meningite pneumocócica.

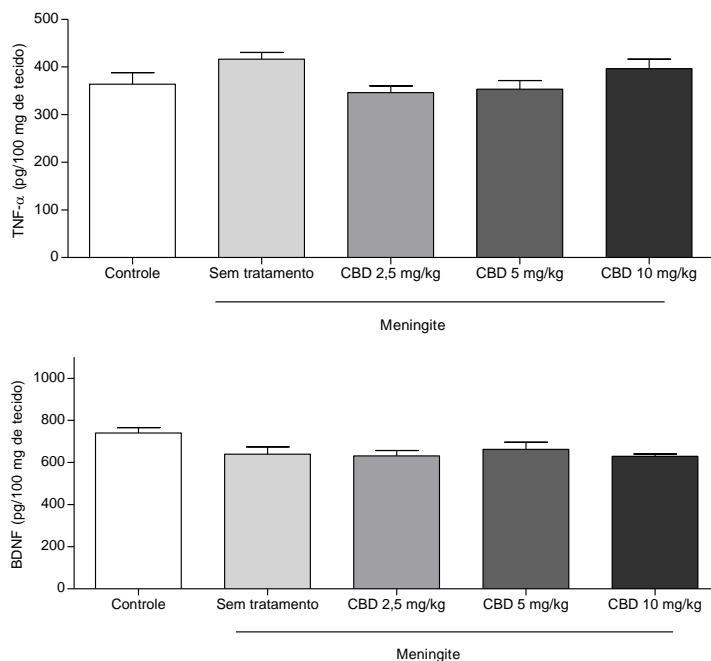


Figura 15: Avaliação dos níveis de TNF- α e BDNF no hipocampo de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os resultados foram apresentados em média \pm EPM, de 6 animais por grupo. As diferenças de cada grupo foram avaliadas através de ANOVA, seguido do *post-hoc* de Tukey.

Na figura 16 são demonstrados os níveis de TNF- α e BDNF no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Foi observado que os níveis de TNF- α aumentaram no grupo meningite e o tratamento com CBD nas doses 2,5 mg/kg; 5 mg/kg e 10 mg/kg diminuíram estes níveis em comparação com o grupo meningite sem tratamento. Os níveis de BDNF foram diminuídos no grupo meningite e o tratamento com CBD nas doses de 2,5 mg/kg; 5 mg/kg e 10 mg/kg aumentaram os níveis de BDNF em comparação com o grupo meningite sem tratamento.

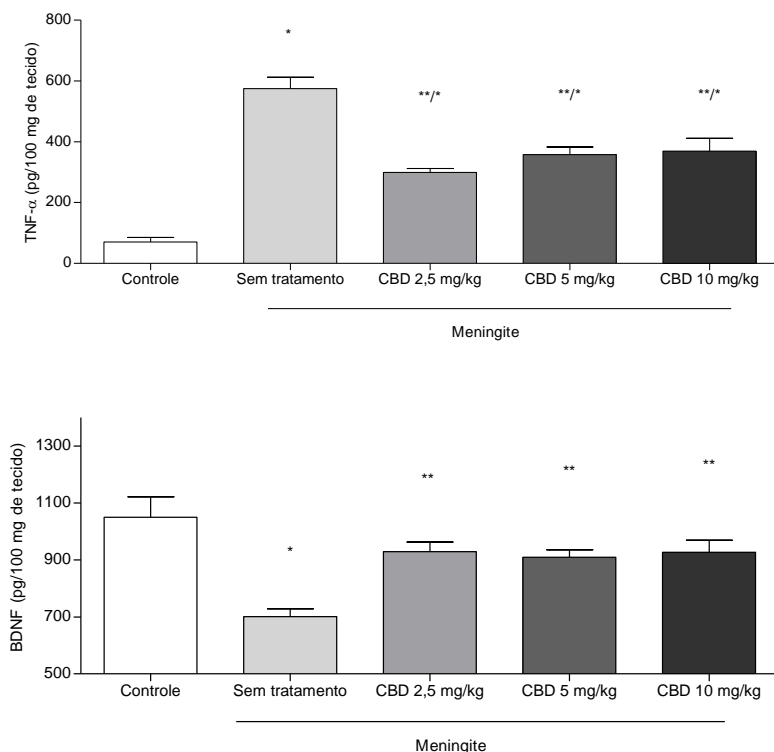


Figura 16: Avaliação dos níveis de TNF- α , e BDNF no córtex pré-frontal de ratos Wistar adultos 10 dias após a indução da meningite por *S. pneumoniae*. Os resultados foram apresentados em média \pm EPM, de 6 animais por grupo. As diferenças de cada grupo foram avaliadas através de ANOVA, seguido do *post-hoc* de Tukey. O símbolo * $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle e o símbolo ** $p < 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo meningite sem tratamento.

5 DISCUSSÃO

Apesar dos significativos avanços no tratamento, a meningite pneumocócica permanece como uma das doenças infecciosas mais importantes em todo o mundo e ainda está associada com altas taxas de mortalidade e morbidade. Além disso, muitos sobreviventes apresentam graves e permanentes sequelas neurológicas (Sellner et al., 2010; Mook-Kanamori et al., 2011). No presente estudo, foram investigados os efeitos do tratamento adjuvante, agudo e prolongado, com CBD sobre o perfil de citocinas pró-inflamatórias e memória aversiva, de habituação e de reconhecimento de objetos. Às 6 horas após a indução da meningite pneumocócica houve um aumento nos níveis de TNF- α e CINC-1 no hipocampo e córtex pré-frontal e a administração de diferentes doses de CBD, 2,5 mg/Kg, 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, não foi capaz de reverter estes níveis em ambas estruturas cerebrais. Em estudos anteriores, com o mesmo modelo experimental de meningite, verificou-se o aumento dos níveis de TNF- α e CINC-1 no hipocampo e no córtex pré-frontal em 6 horas após a indução da meningite pneumocócica (Barichello et al., 2010c). Além disso, no plasma da veia jugular, CINC-1 aumentou em 3 horas permanecendo elevado até 6 horas e os níveis de TNF- α aumentaram às 6 horas após a indução. No plasma arterial verificou-se o aumento de CINC-1 às 6 horas após a indução, indicando que possivelmente CINC-1 e TNF- α são produzidos no SNC (Barichello et al., 2012c). Os mediadores inflamatórios TNF- α , IL-1 β e IL-6, são produzidos durante a resposta imune precoce após a indução da meningite pneumocócica (Tauber e Moser, 1999). TNF- α e CINC-1 também estão implicadas na infiltração de células inflamatórias no parênquima cerebral (Saukkonen et al., 1990; Katayama et al., 2009). No entanto, as propriedades indeterminadas, ações e o local exato em que o CBD possa exercer seus efeitos neuroprotetores e neuroinflamatórios ainda não estão completamente elucidados. A capacidade descoberta de diferentes canabinóides, incluindo CBD, exibir uma atividade de ligação ao receptor extra-canabinóide foi destacada pela observação de que estes compostos podem exercer a sua atividade através da interação com os receptores nucleares ativados pelo receptor proliferador de peroxissoma (PPAR) (O'sullivan, 2007). Além disso, o CBD na concentração de 10 mg/Kg administrado durante 15 dias reduziu a neuroinflamação induzida por β -amilóide e promoveu a neurogênese no hipocampo através de PPAR (Esposito et al., 2011). Em

estudo anterior verificou-se que a meningite pneumocócica também pode levar a alterações na cadeia respiratória mitocondrial (Barichello et al., 2010e) e estresse oxidativo (Barichello et al., 2010d). Além disso, a apoptose durante meningite pneumocócica está correlacionada com a produção de ERO que causa a disfunção mitocondrial levando à liberação do fator de indução de apoptose para o citosol (Mitchell et al., 2004). Independente de receptores clássicos, CB1 e CB2, o CBD (3 e 10 mg/Kg) 2 horas antes da reperfusão de isquemia hepática reduziu a extensão da inflamação hepática, estresse oxidativo e nitrativo e morte celular (Mukhopadhyay et al., 2011). A isquemia/reperfusão hepática também leva ao comprometimento precoce das atividades das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, disfunção mitocondrial, permitindo que ERO sejam produzidas pela cadeia respiratória (Jaeschke, 2003; Moon et al., 2008). Foi demonstrado que o CBD neutralizou a hiperfosforilação em cultura de neurônios pela redução da fosforilação da glicogênio sintase quinase 3-B (GSK3b), atuando como auxiliador na via Wnt/b-catenina, embora os mecanismos alternativos podem estar implicados na indução deste efeito (Esposito et al., 2006). A GSK3b está envolvida na sinalização de receptores de tipo Toll e regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e choque séptico (Woodgett e Ohashi, 2005). Além disso, o CBD diminuiu TNF- α , IL-6 e quimiocinas (MCP-1 e MIP-2) em um modelo animal de lesão pulmonar aguda (Ribeiro et al., 2012). O uso de canabinóide sintético inibiu o aumento de TNF- α , IL-1 β e IL-6 induzido por LPS em células granulares do cerebelo de ratos (Chiba et al., 2011). O CBD reduziu alterações na BHE e impediu resposta inflamatória endotelial em vasodilatação arteriolar e venular, induzida por LPS (Ruiz-Valdepenas et al., 2011). Em outro estudo, foi relatado o aumento dos níveis de TNF- α no córtex pré-frontal 10 dias após a indução da meningite (Barichello et al., 2010b).

No presente estudo, foi observado em animais que receberam o tratamento prolongado com CBD, a diminuição dos níveis de TNF- α no córtex pré-frontal 10 dias após a indução da meningite. Durante a neuroinflamação, células microgliais ativadas migram para o local da lesão, onde produzem e liberam citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores citotóxicos, incluindo ERO. Embora importante na remoção de restos celulares e combate das infecções, as células microgliais ativadas muitas vezes agravam o dano celular local. O CBD preveniu a migração de células da microglia ativadas induzidas por 2AG por antagonizar o receptor sensível ao canabidiol (ABN-CBD) em concentrações $<1 \mu\text{M}$ (Walter et al., 2003). Há evidências de que o

receptor de ABN-CBD é o receptor órfão acoplado à proteína G que foi recentemente relatado (Mchugh et al., 2010). Além disso, o CBD preveniu estresse oxidativo resultante da ativação de células microgliais em modelo de uveíte (El-Remessy et al., 2008). Estudos apontaram, ainda, o CBD tendo ações antidepressivas, a base para as quais não é estabelecido, embora a ativação de receptores serotonina pode estar envolvido, pelo menos em altas concentrações (Pertwee, 2008; El-Alfy et al., 2010; Zanelati et al., 2010). Evidências crescentes nos últimos anos têm implicado citocinas pró-inflamatórias, radicais livres e oxidantes na etiologia da depressão e o CBD possui efeitos anti-inflamatórios (Maes et al., 2011). Uma explicação é de que o estresse oxidativo resultante afeta adversamente a função de células da glia e leva a dano cerebral (Song e Wang, 2011).

Além disso, avaliou-se a memória aversiva, de habituação e de reconhecimento de objetos através do teste de esquiva inibitória, habituação ao campo aberto e reconhecimento de objetos, respectivamente, com tratamento prolongado com CBD em diferentes concentrações de 2,5, 5 e 10 mg/Kg e foi demonstrando que os animais do grupo meningite apresentaram prejuízo de todas as memórias avaliadas, entretanto, apenas a dose de 10 mg/Kg de CBD preveniu dano cognitivo. No estudo de Cassol-Jr e colaboradores, a administração crônica de CBD em diferentes doses (2,5, 5 e 10 mg/kg, ip, por sete dias) também impediu comprometimento da memória de ratos 10 dias após a sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (Cassol-Jr et al., 2010). Já está bem estabelecido que sobreviventes de meningite pneumocócica apresentam comprometimento cognitivo a longo prazo. Em trabalhos anteriores, já foi demonstrado que ratos sobreviventes à meningite pneumocócica tiveram danos de aprendizagem e memória 10 dias após a indução (Barichello et al., 2010f). A replicação de *S. pneumoniae* no interior do espaço subaracnóide inicia uma complexa resposta imune do hospedeiro (Sellner et al., 2010), além disso, o ácido lipoteicóico e peptidoglicano são reconhecidos pelos TLR-2 e pneumolisina por TLR-4 que são receptores presentes em células apresentadoras de antígenos (Mook-Kanamori et al., 2011). Quando esses receptores são ativados eles induzem a ativação do NF- κ B (Opitz et al., 2009). O NF- κ B é também um ativador da transcrição de muitos genes envolvidos na patogênese da meningite pneumocócica, como TNF- α , IL-1 β , síntese de óxido nítrico e de moléculas de adesão intercelulares (Koedel et al., 2000; Kastenbauer et al., 2004). Alguns estudos indicam que o CBD exerce os seus efeitos anti-inflamatórios através da inibição de NF- κ B. Por exemplo, o tratamento CBD inibiu o

NF-kB dependente de RNAm e TNF- α em tecidos de miocárdio diabético (Rajesh et al., 2010). O CBD também reduziu os níveis de IL-1 β , IL-6 e IFN- β e atividade da via de NF-kB, uma via principal que regula a expressão de genes de mediadores pró-inflamatórios em células ativadas por LPS (Kozela et al., 2010).

6. CONCLUSÃO

São necessárias novas terapias farmacológicas para melhorar o prognóstico da meningite bacteriana. Esses resultados demonstram que o tratamento crônico com CBD desempenha um papel anti-inflamatório na meningite pneumocócica. Além disso, previne danos cognitivos, possivelmente representando uma nova abordagem farmacológica para o tratamento de meningite.

Uma compreensão mais detalhada da meningite bacteriana ocasionada pelo *S. pneumoniae*, da indução da resposta inflamatória do hospedeiro e de seus efeitos é sem dúvida desejável e indispensável. Entretanto deve-se reconhecer que grande parte da cascata de eventos esta sendo elucidada. Portanto, esforços para compreender e apoiar a capacidade reparadora do hospedeiro, uma área que até agora tem recebido pouca atenção, pode ser tão importante quanto desvendar os mecanismos que levam a danos.

REFERÊNCIAS

Abdelmoez AT, Zaky DZ, Maher AM. Role of cerebrospinal fluid IL-8 as a marker for differentiation between acute bacterial and aseptic meningitis. *J Egypt Soc Parasitol.* 2014;44(1):205-10.

Abrahao AL, Focaccia R, Gattaz WF. Childhood meningitis increases the risk for adult schizophrenia. *World J Biol Psychiatry.* 2005;6 Suppl 2:44-8.

Alger BE, Kim J. Supply and demand for endocannabinoids. *Trends Neurosci.* 2011;34(6):304-15.

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet.* 2005;365(9453):63-78.

Barichello T, Belarmino E, Jr., Comim CM, Cipriano AL, Generoso JS, Savi GD, Stertz L, Kapczinski F, Quevedo J. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic [correction of neurotrophic] factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol.* 2010a;223(1-2):73-6.

Barichello T, Dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Generoso JS, Comim CM, Sachs D, Teixeira AL, Quevedo J. Depressive-like-behavior and proinflammatory interleukine levels in the brain of rats submitted to pneumococcal meningitis. *Brain Res Bull.* 2010b;82(5-6):243-6.

Barichello T, dos Santos I, Savi GD, Simoes LR, Silvestre T, Comim CM, Sachs D, Teixeira MM, Teixeira AL, Quevedo J. TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, and cinc-1 levels in rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *J Neuroimmunol.* 2010c;221(1-2):42-5.

Barichello T, Fagundes GD, Generoso JS, Paula Moreira A, Costa CS, Zanatta JR, Simoes LR, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Carvalho Vilela M, Lucio Teixeira A. Brain-blood barrier breakdown and pro-inflammatory mediators in neonate rats submitted meningitis by *Streptococcus pneumoniae*. *Brain Res.* 2012a;1471:162-8.

Barichello T, Generoso JS, Collodel A, Moreira AP, Almeida SM. Pathophysiology of acute meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* and adjunctive therapy approaches. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012b;70(5):366-72.

Barichello T, Generoso JS, Silvestre C, Costa CS, Carrodore MM, Cipriano AL, Michelon CM, Petronilho F, Dal-Pizzol F, Vilela MC, Teixeira AL. Circulating concentrations, cerebral output of the CINC-1 and blood-brain barrier disruption in Wistar rats after pneumococcal meningitis induction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012c;31(8):2005-9.

Barichello T, Generoso JS, Simoes LR, Faller CJ, Ceretta RA, Petronilho F, Lopes-Borges J, Valvassori SS, Quevedo J. Sodium Butyrate Prevents Memory Impairment by Re-establishing BDNF and GDNF Expression in Experimental Pneumococcal Meningitis. *Mol Neurobiol*. 2014;5:5.

Barichello T, Savi GD, Silva GZ, Generoso JS, Bellettini G, Vuolo F, Petronilho F, Feier G, Comim CM, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antibiotic therapy prevents, in part, the oxidative stress in the rat brain after meningitis induced by *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett*. 2010d;478(2):93-6.

Barichello T, Savi GD, Simoes LR, Generoso JS, Fraga DB, Bellettini G, Daufenbach JF, Rezin GT, Scaini G, Streck EL. Evaluation of mitochondrial respiratory chain in the brain of rats after pneumococcal meningitis. *Brain Res Bull*. 2010e;82(5-6):302-7.

Barichello T, Silva GZ, Generoso JS, Savi GD, Michelon CM, Feier G, Comim CM, Quevedo J. Time-dependent behavioral recovery after pneumococcal meningitis in rats. *J Neural Transm*. 2010f;117(7):819-26.

Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, Paton JC. Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1989;57(7):2037-42.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term

memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci.* 2003;17(4):897-902.

Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004;22(3):123-31.

Booz GW. Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(5):1054-61.

Brandt CT. Experimental studies of pneumococcal meningitis. *Dan Med Bull.* 2010;57(1):B4119.

Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):467-92.

Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimaraes FS. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1607):3364-78.

Cassol-Jr OJ, Comim CM, Silva BR, Hermani FV, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Hallak JE, De Martinis BS, Zuardi AW, Crippa JA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res.* 2010;12:128-38.

Ceyhan M, Yildirim I, Balmer P, Borrow R, Dikici B, Turgut M, Kurt N, Aydogan A, Ecevit C, Anlar Y, Gulumser O, Tanir G, Salman N, Gurler N, Hatipoglu N, Hacimustafaoglu M, Celebi S, Coskun Y, Alhan E, Celik U, Camcioglu Y, Secmeer G, Gur D, Gray S. A prospective study of etiology of childhood acute bacterial meningitis, Turkey. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1089-96.

Chiba T, Ueno S, Obara Y, Nakahata N. A synthetic cannabinoid, CP55940, inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine mRNA expression in a cannabinoid receptor-independent mechanism in rat cerebellar granule cells. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63(5):636-47.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.

Cottagnoud PH, Tauber MG. New therapies for pneumococcal meningitis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13(4):393-401.

de Lima MN, Laranja DC, Bromberg E, Roesler R, Schroder N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav Brain Res*. 2005;156(1):139-43.

del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol*. 2000;10(1):95-112.

Devane WA. New dawn of cannabinoid pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1994;15(2):40-1.

Dinareello CA. Interleukin-1beta. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S460-2.

Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(5):317-28.

El-Alfy AT, Ivey K, Robinson K, Ahmed S, Radwan M, Slade D, Khan I, ElSohly M, Ross S. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010;95(4):434-42.

El-Remessy AB, Tang Y, Zhu G, Matragoon S, Khalifa Y, Liu EK, Liu JY, Hanson E, Mian S, Fattah N, Liou GI. Neuroprotective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation. *Mol Vis*. 2008;14:2190-203.

Esposito G, De Filippis D, Carnuccio R, Izzo AA, Iuvone T. The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med*. 2006;84(3):253-8.

Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, Cipriano M, Carratu MR, Iuvone T, Steardo L. Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARgamma involvement. *PLoS One*. 2011;6(12):5.

Frey BN, Andreazza AC, Cereser KM, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Quevedo J, Kapczinski F. Effects of mood stabilizers on hippocampus BDNF levels in an animal model of mania. *Life Sci*. 2006a;79(3):281-6.

Frey BN, Andreazza AC, Rosa AR, Martins MR, Valvassori SS, Reus GZ, Hatch JP, Quevedo J, Kapczinski F. Lithium increases nerve growth factor levels in the rat hippocampus in an animal model of mania. *Behav Pharmacol*. 2006b;17(4):311-8.

Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *Journal of the American Chemical Society*. 1964;86(8):1646-7.

Garcia-Arencibia M, Gonzalez S, de Lago E, Ramos JA, Mechoulam R, Fernandez-Ruiz J. Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain Res*. 2007;23(1):162-70.

Gianinazzi C, Grandgirard D, Simon F, Imboden H, Joss P, Tauber MG, Leib SL. Apoptosis of hippocampal neurons in organotypic slice culture models: direct effect of bacteria revisited. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63(6):610-7.

Graham ES, Ashton JC, Glass M. Cannabinoid receptors: a brief history and "what's hot". *Front Biosci*. 2009;14:944-57.

Grandgirard D, Bifare YD, Pleasure SJ, Kummer J, Leib SL, Tauber MG. Pneumococcal meningitis induces apoptosis in recently postmitotic immature neurons in the dentate gyrus of neonatal rats. *Dev Neurosci*. 2007a;29(1-2):134-42.

Grandgirard D, Steiner O, Tauber MG, Leib SL. An infant mouse model of brain damage in pneumococcal meningitis. *Acta Neuropathol.* 2007b;114(6):609-17.

Hamelink C, Hampson A, Wink DA, Eiden LE, Eskay RL. Comparison of cannabidiol, antioxidants, and diuretics in reversing binge ethanol-induced neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314(2):780-8.

Hanna S, Etzioni A. Leukocyte adhesion deficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1250:50-5.

Harvey RM, Hughes CE, Paton AW, Trappetti C, Tweten RK, Paton JC. The impact of pneumolysin on the macrophage response to *Streptococcus pneumoniae* is strain-dependent. *PLoS One.* 2014;9(8).

Hill AJ, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. Phytocannabinoids as novel therapeutic agents in CNS disorders. *Pharmacol Ther.* 2012;133(1):79-97.

Honda H, Warren DK. Central nervous system infections: meningitis and brain abscess. *Infect Dis Clin North Am.* 2009; 23(3): 609-23.

Hoogman M, van de Beek D, Weisfelt M, de Gans J, Schmand B. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78(10):1092-6.

Huang TL, Lee CT, Liu YL. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in patients with major depression: effects of antidepressants. *J Psychiatr Res.* 2008;42(7):521-5.

Irazuzta J, Pretzlaff RK, DeCourten-Myers G, Zemlan F, Zingarelli B. Dexamethasone decreases neurological sequelae and caspase activity. *Intensive Care Med.* 2005;31(1):146-50.

Irazuzta J, Pretzlaff RK, Zingarelli B. Caspases inhibition decreases neurological sequelae in meningitis. *Crit Care Med.* 2008;36(5):1603-6.

Izadpanah K, Freyer D, Weber JR, Braun JS. Brain parenchymal TNF-alpha and IL-1beta induction in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuroimmunol.* 2014;276(1-2):104-11.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 1998;393(6686):635-6.

Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 2009;30(10):515-27.

Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 284(1): G15-26.

Janeway C, Travers P. Immunobiology. The immune system in health and disease. 8 ed ed. New York 2014.

Jauneikaite E, Jefferies JM, Hibberd ML, Clarke SC. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotypes causing invasive and non-invasive disease in South East Asia: a review. *Vaccine.* 2012;30(24):3503-14.

Kastenbauer S, Koedel U, Becker BF, Pfister HW. Oxidative stress in bacterial meningitis in humans. *Neurology.* 2002;58(2):186-91.

Kastenbauer S, Koedel U, Weih F, Ziegler-Heitbrock L, Pfister HW. Protective role of NF-kappaB1 (p50) in experimental pneumococcal meningitis. *Eur J Pharmacol.* 2004;498(1-3):315-8.

Kastenbauer S, Pfister HW. Pneumococcal meningitis in adults: spectrum of complications and prognostic factors in a series of 87 cases. *Brain.* 2003;126(Pt 5):1015-25.

Katayama T, Tanaka H, Yoshida T, Uehara T, Minami M. Neuronal injury induces cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production in astrocytes. *J Pharmacol Sci.* 2009;109(1):88-93.

Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(1):32-42.

King SJ, Hippe KR, Weiser JN. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. Mol Microbiol. 2006;59(3):961-74.

Klein M, Koedel U, Pfister HW. Oxidative stress in pneumococcal meningitis: a future target for adjunctive therapy? Prog Neurobiol. 2006;80(6):269-80.

Koedel U, Bayerlein I, Paul R, Sporer B, Pfister HW. Pharmacologic interference with NF-kappaB activation attenuates central nervous system complications in experimental Pneumococcal meningitis. J Infect Dis. 2000;182(5):1437-45.

Kozela E, Lev N, Kaushansky N, Eilam R, Rimmerman N, Levy R, Ben-Nun A, Juknat A, Vogel Z. Cannabidiol inhibits pathogenic T cells, decreases spinal microglial activation and ameliorates multiple sclerosis-like disease in C57BL/6 mice. British Journal of Pharmacology. 2011;163(7):1507-19.

Kozela E, Pietr M, Juknat A, Rimmerman N, Levy R, Vogel Z. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. J Biol Chem. 2010;285(3):1616-26.

Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, Alvarez A, Rey-Santano MC, Mielgo V, Murgia-Esteve X, Hilario E, Martinez-Orgado J. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. Pediatr Res. 2011;70(3):272-7.

Li L, Shui QX, Liang K, Ren H. Brain-derived neurotrophic factor rescues neurons from bacterial meningitis. Pediatr Neurol. 2007;36(5):324-9.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2011;35(3):676-92.

Martner A, Dahlgren C, Paton JC, Wold AE. Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun*. 2008;76(9):4079-87.

Maxeiner HG, Marion Schneider E, Kurfiss ST, Brettschneider J, Tumani H, Bechter K. Cerebrospinal fluid and serum cytokine profiling to detect immune control of infectious and inflammatory neurological and psychiatric diseases. *Cytokine*. 2014;69(1):62-7.

McHugh D, Hu SS, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM, Bradshaw HB. N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potently drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neurosci*. 2010;11(44):1471-2202.

McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol*. 2008;73(2):441-50.

McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet*. 2012;380(9854):1703-11.

Mecha M, Feliú A, Iñigo PM, Mestre L, Carrillo-Salinas FJ, Guaza C. Cannabidiol provides long-lasting protection against the deleterious effects of inflammation in a viral model of multiple sclerosis: A role for A2A receptors. *Neurobiology of Disease*. 2013;59:141-50.

Meli DN, Christen S, Leib SL, Tauber MG. Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15(3):253-7.

Mishima K, Hayakawa K, Abe K, Ikeda T, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine1A receptor-dependent mechanism. *Stroke*. 2005;36(5):1077-82.

Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. Clin Microbiol Infect. 2010;16(5):411-8.

Mitchell D, Yong M, Schroder W, Black M, Tirrell M, Olive C. Dual stimulation of MyD88-dependent Toll-like receptors induces synergistically enhanced production of inflammatory cytokines in murine bone marrow-derived dendritic cells. J Infect Dis. 2010;202(2):318-29.

Mitchell L, Smith SH, Braun JS, Herzog KH, Weber JR, Tuomanen EI. Dual phases of apoptosis in pneumococcal meningitis. J Infect Dis. 2004;190(11):2039-46.

Mook-Kanamori BB, Geldhoff M, van der Poll T, van de Beek D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):557-91.

Moon KH, Hood BL, Mukhopadhyay P, Rajesh M, Abdelmegeed MA, Kwon YI, Conrads TP, Veenstra TD, Song BJ, Pacher P. Oxidative inactivation of key mitochondrial proteins leads to dysfunction and injury in hepatic ischemia reperfusion. Gastroenterology. 2008;135(4):1344-57.

Morichi S, Kashiwagi Y, Takekuma K, Hoshika A, Kawashima H. Expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerebrospinal fluid and plasma of children with meningitis and encephalitis/encephalopathy. Int J Neurosci. 2013;123(1):17-23.

Moscoso M, Garcia E, Lopez R. Pneumococcal biofilms. Int Microbiol. 2009;12(2):77-85.

Mukhopadhyay P, Rajesh M, Horvath B, Batkai S, Park O, Tanchian G, Gao RY, Patel V, Wink DA, Liaudet L, Hasko G, Mechoulam R, Pacher P. Cannabidiol protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating inflammatory signaling and response, oxidative/nitrative stress, and cell death. Free Radic Biol Med. 2011;50(10):1368-81.

Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN. Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. Infect Immun. 2007;75(1):83-90.

O'Sullivan SE. Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2007;152(5):576-82.

Okike IO, Ribeiro S, Ramsay ME, Heath PT, Sharland M, Ladhani SN. Trends in bacterial, mycobacterial, and fungal meningitis in England and Wales 2004-11: an observational study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(4):301-7.

Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost.* 2009;102(6):1103-9.

Ostergaard C, Brandt C, Konradsen HB, Samuelsson S. Differences in survival, brain damage, and cerebrospinal fluid cytokine kinetics due to meningitis caused by 3 different *Streptococcus pneumoniae* serotypes: evaluation in humans and in 2 experimental models. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1212-20.

Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):199-215.

Price KE, Camilli A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* 2009;191(7):2163-8.

Quevedo J, Vianna M, Zanatta MS, Roesler R, Izquierdo I, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA. Involvement of mechanisms dependent on NMDA receptors, nitric oxide and protein kinase A in the hippocampus but not in the caudate nucleus in memory. *Behav Pharmacol.* 1997;8(8):713-7.

Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, Patel V, Saito K, Matsumoto S, Kashiwaya Y, Horvath B, Mukhopadhyay B, Becker L, Hasko G, Liaudet L, Wink DA, Veves A, Mechoulam R, Pacher P. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(25):2115-25.

Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family settings. Clin Infect Dis. 2004;38(5):632-9.

Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Vitoretti LB, Mariano-Souza DP, Quinteiro-Filho WM, Akamine AT, Almeida VI, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Palermo-Neto J. Cannabidiol, a non-psychotropic plant-derived cannabinoid, decreases inflammation in a murine model of acute lung injury: role for the adenosine A(2A) receptor. Eur J Pharmacol. 2012;678(1-3):78-85.

Richie MB, Josephson SA. A Practical Approach to Meningitis and Encephalitis. Semin Neurol. 2015;35(6):611-20.

Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. Trends Immunol. 2012;33(11):571-7.

Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. Brain Res. 2003;975(1-2):207-13.

Ruiz-Valdepenas L, Martinez-Orgado JA, Benito C, Millan A, Tolon RM, Romero J. Cannabidiol reduces lipopolysaccharide-induced vascular changes and inflammation in the mouse brain: an intravital microscopy study. J Neuroinflammation. 2011;8(1):1742-2094.

Saito VM, Rezende RM, Teixeira AL. Cannabinoid modulation of neuroinflammatory disorders. Curr Neuroparmacol. 2012;10(2):159-66.

Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. J Exp Med. 1990;171(2):439-48.

Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases. Front Immunol. 2013;4(387):00387.

Sellner J, Tauber MG, Leib SL. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial CNS infections. *Handb Clin Neurol*. 2010;96:1-16.

Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*. 2008;64(6):527-32.

Song C, Wang H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011;35(3):760-8.

Song M, Kellum JA. Interleukin-6. *Crit Care Med*. 2005;33(12 Suppl):S463-5.

Takahashi W, Nakada TA, Abe R, Tanaka K, Matsumura Y, Oda S. Usefulness of interleukin 6 levels in the cerebrospinal fluid for the diagnosis of bacterial meningitis. *J Crit Care*. 2014;29(4):5.

Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology*. 2010;215(8):588-97.

Tauber MG, Moser B. Cytokines and chemokines in meningeal inflammation: biology and clinical implications. *Clin Infect Dis*. 1999;28(1):1-11.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An introduction*. 10 th ed: Pearson Education, Inc;2012.

van de Beek D, Schmand B, de Gans J, Weisfelt M, Vaessen H, Dankert J, Vermeulen M. Cognitive impairment in adults with good recovery after bacterial meningitis. *J Infect Dis*. 2002;186(7):1047-52.

van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 2009;374(9700):1543-56.

Varon E. [Epidemiology of acute bacterial meningitis in adult patients in France]. *Med Mal Infect*. 2009;39(7-8):432-44.

Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. Role of hippocampal signaling

pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem.* 2000;7(5):333-40.

Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci.* 2003;23(4):1398-405.

Woodgett JR, Ohashi PS. GSK3: an in-Toll-erant protein kinase?. *Nat Immunol.* 2005;6(8):751-2.

Yamada S, Iida T, Tabata T, Nomoto M, Kishikawa H, Kohno K, Eto S. Alcoholic fatty liver differentially induces a neutrophil-chemokine and hepatic necrosis after ischemia-reperfusion in rat. *Hepatology.* 2000;32(2):278-88.

Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimaraes FS, Joca SR. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol.* 2010;159(1):122-8.

Zingarelli B. Nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med.* 2005;33(12 Suppl):S414-6.

Zuardi AW, Crippa JA, Hallak JE, Moreira FA, Guimaraes FS. Cannabidiol, a Cannabis sativa constituent, as an antipsychotic drug. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(4):421-9.

ANEXO

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o adendo abaixo.

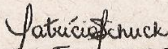
Protocolo: AD-97/2012

Professor Responsável: Tatiana Barichello

Título: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CANIBIDIOL SOBRE OS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E O PERFIL PRÓ-INFLAMATÓRIO EM RATOS WISTAR ADULTOS SUBMETIDOS À MENINGITE PNEUMOCÓCICA"

Este adendo foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização 245 ratos Wistar adultos. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.

Criciúma, 25 de setembro de 2012.


Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA